

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

Departamento de Fisiología



**MECANISMOS IÓNICOS DE ACOPLAMIENTO EN
LA SECRECIÓN PANCREÁTICA**

Memoria que presenta **D. Antonio González Mateos**
para aspirar al *Título de Doctor en Veterinaria*

Cáceres, Julio 1996.

D. José Antonio Pariente Llanos, Profesor Titular de Universidad, y **D. Pedro Javier Camello Almaraz**, Profesor Asociado, del Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura en la Facultad de Veterinaria de Cáceres

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, elaborada por **D. Antonio González Mateos** con el título *MECANISMOS IÓNICOS DE ACOPLAMIENTO EN LA SECRECIÓN PANCREÁTICA* 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 doce, de junio de mil novecientos noventa y seis



Fdo.: Dr. D. J. A. Pariente Llanos



Fdo. Dr. D. P.J. Camello Almaraz

Esta Tesis Doctoral he sido financiada íntegramente por el Ministerio de Educación y Ciencia a través del proyecto **DGICYT PB91-0463**.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a:

El *Dr. D. Ginés María Salido Ruiz*, Catedrático en la Unidad de Fisiología de la Facultad de Veterinaria en Cáceres y Director del Departamento de Fisiología, quien me dio la oportunidad de iniciarme en la investigación científica, por la confianza que depositó en mí y por la inestimable ayuda y amistad que siempre me ha ofrecido desde mi llegada a este Departamento,

Los *Doctores D. José Antonio Pariente Llanos* y *D. Pedro Javier Camello Almaraz*, Directores de esta Tesis Doctoral, por su acertada dirección y formación, así como por el constante aliento y todos los consejos con que me han ayudado,

La *Dra. D^{ña}. María José Pozo Andrada*, Catedrática en la Escuela de Enfermería de Cáceres, por su cooperación y amistad constantes,

El *Dr. Jaipaul Singh*, *Professor* de Fisiología en la Universidad de Central Lancashire en Preston (Reino Unido), en cuyo Departamento tuve la oportunidad de desarrollar técnicas que posteriormente han dado fruto a algunos de los resultados que se muestran en la presente Tesis Doctoral, y por los consejos que siempre estuvo dispuesto a darme,

A los doctorandos *D^{ña}. Ana Isabel Lajas Petisco*, *D^{ña}. Soledad Alcón González* y *D. Juan Antonio Rosado Dionisio*, por todas las horas de trabajo que hemos compartido así como los buenos momentos que hemos pasado juntos,

A los becarios *D^{ña}. Cristina Camello Almaraz* y *D. José Antonio Tapia García* que también han compartido conmigo muchas horas de trabajo y momentos de satisfacción,

A *D^{ña}. Mercedes Gómez Blázquez*, quien no por citarla al término de esta relación debería considerarse la última, por su compañía y la enorme amabilidad que siempre gastó conmigo a lo largo del tiempo que he dedicado a mi formación desde que concluí el último curso de la Licenciatura,

Al *Ministerio de Educación y Ciencia* por concederme la Beca de Investigación gracias a la cual ha sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A todos ellos muchas gracias.

A mis padres, a mi abuela y a mi hermano

El pensamiento más difundido entre todos los científicos es que si hay algo que se puede medir, entonces debe ser muy importante

Thomas, R.C. "Intracellular pH"
en Acid-Base balance

ABREVIATURAS

- AA: ácido araquidónico
- a.a.: aminoácido
- AC: adenilato ciclasa
- ACh: acetilcolina
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADP: difosfato de adenosina
- AMPc: 3,5 monofosfato cíclico de adenosina
- ARN: ácido ribonucleico
- ATP: trifosfato de adenosina
- AP: ácido fosfatídico
- BSA: albúmina sérica bovina
- Ca^{2+} : ion calcio
- $[\text{Ca}^{2+}]_i$: concentración de calcio libre citoplasmático
- $[\text{Ca}^{2+}]_o$: concentración de calcio libre extracelular
- CAM: calmodulina
- CCK: colecistokinina
- CCK-8: octapéptido de colecistokinina
- CICR: liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}
- CRAC: corrientes activadas por la liberación de Ca^{2+}
- CTP: fosfocolina citidil transferasa

- DG: 1,2 diacilglicerol
- DIDS: 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfonato
- DMO: 5'5-dimetil-4'4-oxazolidinediona
- EGF: factor de crecimiento epidermal
- FBS: suero fetal bovino
- FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
- GDP: difosfato de guanina
- GMPc: monofosfato de guanosina cíclica
- GRP: péptido liberador de gastrina
- GTP: trifosfato de guanina
- H1+: agonista de los receptores H1 para la histamina.
- H2+: agonista de los receptores H2 para la histamina.
- H3+: agonista de los receptores H3 para la histamina.
- IBMX: isobutil metil xantina
- PIP: fosfatidilinositol 1-fosfato
- 1,3,4-IP₃: inositol 1,3,4-trifosfato
- 1,3,4,5-IP₄: inositol 1,3,4,5-tetrafosfato
- 1,3,4,6-IP₄: inositol 1,3,4,6-tetrafosfato
- 1,4-IP₂: inositol 1,4-difosfato
- IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato

- IP₅: inositol pentafosfato
- IP₆: inositol hexafosfato
- PI-3P: fosfatidilinositol 3-fosfato
- PI-4P: fosfatidilinositol 4-fosfato
- M. ES.Aa: medio esencial de aminoácidos
- Mg²⁺: ion magnesio
- [Mg²⁺]_i: concentración de magnesio libre citoplasmático
- [Mg²⁺]_o: concentración de magnesio libre extracelular
- MJJ: medio salino fisiológico
- MLCK: cinasa de las cadenas ligeras de miosina
- NMDG: N-metil-D-glucamina
- NMR: resonancia magnética nuclear
- NO: óxido nítrico
- OA: ácido ocadáico
- PACAP: péptido pituitario activador de la adenilato ciclasa
- PC: fosfatidilcolina
- pH_i: pH intracelular
- pH_o: pH extracelular
- PHI: péptido histidina-isoleucina
- PI: fosfatidilinositol

- PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-difosfato
- PKC: proteína cinasa C
- PK AII: proteína cinasa AII
- PLA₂: fosfolipasa A2
- PLC: fosfolipasa C
- PLD: fosfolipasa D
- PP: polipéptido pancreático
- RE: retículo endoplásmico
- RS: retículo sarcoplásmico
- RVD: disminución reguladora del volumen celular
- RVI: incremento regulador del volumen celular
- SITS: 4-acetamido-4'-isotiocianoestilbeno-2,2'-disulfonato
- SNC: sistema nervioso central
- TPA: 13-acetato de 12-O-tetradecanoil forbol
- VIP: péptido intestinal vasoactivo

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	28
2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	31
2.1.- <i>El acino pancreático.</i>	33
2.2.- <i>La célula centroacinar.</i>	36
2.3.- <i>Los conductos pancreáticos.</i>	36
2.4.- <i>Control de la secreción pancreática exocrina.</i>	39
2.4.1.- Control Nervioso.....	39
2.4.1.1.- Colinérgico.....	39
2.4.1.2.- Adrenérgico.....	40
2.4.1.3.- Inervación petidérgica.....	41
2.4.2.- CONTROL HUMORAL.....	41
2.4.2.1.- Secretina y péptidos relacionados.....	41
2.4.2.2.- Colecistocinina (CCK).....	43
2.4.2.3.- Otras hormonas y factores reguladores.....	45
2.5.- <i>Acoplamiento estímulo-secreción en el páncreas exocrino.</i>	49
2.5.1.- SEÑALES DE TRANSMEMBRANA.....	52
2.5.1.1.- Proteínas G.....	52
2.5.1.2.- Efectores de membrana (fosfolipasa C y adenilato ciclasa).....	56
2.5.2.- MENSAJEROS INTRACELULARES.....	59
2.5.2.1.- Inositol 1,4,5-trifosfato.....	59
2.5.2.2.- Calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$	62
2.5.2.2.1.- Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares.....	65
2.5.2.2.2.- Salida del Ca^{2+} desde el citoplasma.....	67
2.5.2.2.3.- Oscilaciones de Ca^{2+}	68
2.5.2.2.4.- Aspectos espaciales de la señal de Ca^{2+}	73
2.5.2.2.5.- Entrada de Ca^{2+} extracelular.....	74
2.5.2.2.6.- Recarga de los depósitos de Ca^{2+}	76
2.5.2.2.7.- Mecanismos efectores del Ca^{2+} : Ca^{2+} -calmodulina.....	77
2.5.2.3.- 1,2-diacilglicerol y proteína cinasa C.....	78
2.5.2.4.- Nucleótidos cíclicos.....	82
2.5.2.4.1.- Adenosina monofosfato cíclica.....	82

2.5.2.4.2.- Guanosina monofosfato cíclica (GMPc).....	85
2.5.2.5.- Acido araquidónico (AA).....	85
2.5.3.- Acciones De Los Mensajeros Intracelulares: Efectores.....	86
2.5.3.1.- Proteina cinasa C.....	86
2.5.3.2.- Cinasas activadas por nucleótidos cíclicos.	87
2.5.3.3.- Ca ²⁺ -calmodulina.	87
2.5.3.4.- Fosfatasas.	88
2.5.3.5.- Fosforilación de proteínas.	89
2.5.4.- Interacciones Entre Secretagogos En El Pancreas Exocrino.....	90
2.6.- <i>Importancia del ion Mg²⁺ en la secreción pancreática.</i>	91
2.6.1.- ASPECTOS ESPACIOTEMORALES DE LA SEÑAL DE Mg ²⁺	93
2.6.2.- MECANISMOS DE TRANSPORTE DE Mg ²⁺	93
2.6.3.- RELACIÓN ENTRE Mg ²⁺ Y Ca ²⁺ EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN EL PÁNCREAS EXOCRINO.....	95
2.7.- <i>pH intracelular.</i>	96
2.7.1.- MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL pH _i	98
2.7.2.- REGULACIÓN DEL pH _i	100
2.7.2.1.- Regulación del pH _i a corto plazo: tampones intracelulares. ..	101
2.7.2.2.- Regulación del pH _i : mecanismos de extrusión de ácido.	103
2.7.2.2.1.- Intercambiador Na ⁺ /H ⁺	103
2.7.2.2.2.- Sistemas dependientes de HCO ₃ ⁻	107
2.7.2.2.3.- Bombas de H ⁺	112
2.7.3.- EL ION H ⁺ COMO MENSAJERO INTRACELULAR.	114
2.7.4.- REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR.....	115
2.7.5.- CALCIO INTRACELULAR Y pH _i	117
2.7.6.- MAGNESIO INTRACELULAR Y pH _i	121
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	122
3.1.- LISTA DE REACTIVOS.	123
3.2.- ANIMALES DE ESTUDIO.	125
3.3.- EXPERIMENTOS CON SUSPENSIONES ACINARES.....	126
3.3.1.- <i>Aislamiento De Las Celulas Acinares Pancreaticas.</i>	126

3.3.2.- <i>Determinacion De La Concentracion De Calcio Intracelular</i>	128
3.3.2.1.- Introducción.....	128
3.3.2.2.- Carga con el indicador.....	128
3.3.2.3.- Cuantificación de la fluorescencia y $[Ca^{2+}]_i$	129
3.3.3.- <i>Determinacion De La Concentracion De Magnesio Intracelular</i>	135
3.3.3.1.- Introducción.....	135
3.3.3.2.- Carga con el indicador.....	136
3.3.3.3.- Cuantificación de la fluorescencia y $[Mg^{2+}]_i$	138
3.4.- EXPERIMENTOS CON CÉLULAS AISLADAS.....	145
3.4.1.- <i>Aislamiento de las celulas acinares pancreaticas</i>	145
3.4.2.- <i>Seguimiento continuo de la fluorescencia en celulas aisladas</i>	148
3.4.3.- <i>ANÁLISIS DIGITAL DE LA $[Ca^{2+}]_i$</i>	151
3.4.3.1.- El sistema de detección.....	151
3.4.3.2.- El software.....	152
3.4.3.3.- Captura de imágenes y análisis.....	153
3.4.4.- <i>Determinacion de la $[Ca^{2+}]_i$</i>	153
3.4.4.1.-Carga con el indicador.....	153
3.4.4.2.- Cuantificación de la fluorescencia y $[Ca^{2+}]_i$	153
3.4.5.- <i>Determinacion de las variaciones de pH intracelular</i>	154
3.4.5.1.- Introducción.....	154
3.4.5.2.- Carga con el indicador.....	157
3.4.5.3.- Cuantificación de la fluorescencia y determinación de los valores de pH_i	158
3.5.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	166
4.- RESULTADOS.....	167
4.1- DETERMINACIÓN DE LA $[Ca^{2+}]_i$ EN SUSPENSIONES ACINARES. 168	
4.1.1.- <i>Efecto de la ACh sobre la $[Ca^{2+}]_i$</i>	168
4.1.2.- <i>Efecto de la histamina sobre la $[Ca^{2+}]_i$</i>	173
4.1.3.- <i>Efectos de los agonistas de los receptores de la histamina sobre la $[Ca^{2+}]_i$</i>	175
4.2- DETERMINACIÓN DE LA $[Mg^{2+}]_i$ EN SUSPENSIONES ACINARES. 182	
4.2.1.- <i>Efectos de la cck-8 y la ACh sobre la $[Mg^{2+}]_i$</i>	182

4.2.2.- Efecto de la histamina sobre la $[Mg^{2+}]_i$	189
4.2.3.- Efectos de la CCK-8 y la ACh sobre la $[Mg^{2+}]_o$	191
4.2.4.- Efecto de la histamina sobre la $[Mg^{2+}]_o$	195
4.3 EXPERIMENTOS EN CÉLULAS AISLADAS.	198
4.3.1.- Efecto de los secretagogos sobre el pH_i	198
4.3.2.- Papel del Ca^{2+} en la acidificación producida por la CCK-8.....	203
4.3.3.- Papel de la PK-C en la acidificación producida por CCK-8.	223
4.3.4.- Cambios de volumen celular y variaciones de pH_i	225
4.3.5.- Intercambio Na^+/H^+ y acidificación por CCK-8.	227
4.3.6.- Efecto del pH_i sobre la $[Ca^{2+}]_i$	235
4.3.7.- Efecto del pH_i sobre el influx del Ca^{2+}	252
DISCUSIÓN	255
5.1- EXPERIMENTOS EN SUSPENSIONES ACINARES.	256
5.1.1.- Efecto de la CCK-8, ACh, histamina y agonistas de los receptores de la histamina sobre la $[Ca^{2+}]_i$	257
5.1.2.- Cambios en la concentración de magnesio respuesta a la estimulación de las células acinares pancreáticas.	257
5.2.- EXPERIMENTOS EN CÉLULAS AISLADAS.	260
5.2.1.- Efecto de la CCK-8 y la ACh sobre el pH_i	260
5.2.2.- Efecto de las modificaciones del pH_i sobre la $[Ca^{2+}]_i$	266
CONCLUSIONES	270
BIBLIOGRAFÍA	272

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ANTECEDENTES

Figura 1. Micrografía de una sección de páncreas de cobaya que muestra la estructura de un acino. En la misma se puede observar el polo apical de las células acinares, rico en gránulos de zimógeno, y el polo basolateral, conteniendo el RE. Tomado de: *Physiology of The Gastrointestinal Tract; The Pancreatic Acinar Cell: Structure-Function Relationships*. Gorelick F.S. y Jamieson, J.D. pp 1353-1376.

Figura 2. **A.** Esquema que muestra el árbol formado por los conductos pancreáticos en la rata, ratón y hámster. **B.** Micrografía al microscopio electrónico que muestra una imagen de un lóbulo pancreático (A) con sus conductos intercalados (flecha). Tomado de: *Physiology of The Gastrointestinal Tract; Pancreatic Ducts: Cellular Mechanism and Control of Bicarbonate Secretion*. Argent, B.E. y Case, R.M. pp 1473-1497.

Figura 3. Esquema de los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción en el páncreas exocrino. Tomado de: *Physiology of The Gastrointestinal Tract; Stimulus-Secretion Coupling in the Pancreatic Acinus*. Yule D.I. y Williams, J.A. pp 1447-1472.

Figura 4. Representación esquemática del mecanismo propuesto para la regulación de la actividad de la adenilato ciclasa (AC). C: subunidad catalítica de la AC. CT: toxina del cólera. Hi: ligandos inhibidores de la AC. Hs: ligandos estimuladores de la AC. Gi: proteína G inhibidora de la AC. Gs: proteína G estimuladora de la AC. PT: toxina pertusis. Ri: receptor inhibidor. Rs: receptor estimulador. α, β, γ : complejo α, β, γ de la proteína G respectiva. Tomado de: *Handbook of Physiology III. The Gastrointestinal System. Signaling Transduction in Hormone- and Neurotransmitter-induced enzyme secretion from the exocrine pancreas*. Schulz, I.

Figura 5. Representación esquemática del modelo propuesto para el acoplamiento de los receptores a la fosfolipasa C (PLC). Tomado de: *Handbook of Physiology III. The Gastrointestinal System. Signaling Transduction in Hormone- and Neurotransmitter-induced enzyme secretion from the exocrine pancreas*. Schulz, I.

Figura 6. Gráfico que muestra la formación de IP_3 tras la estimulación de acinos pancreáticos con CCK. Tras la estimulación se alcanzó un máximo en la formación de

IP₃ a los 5 segundos y posteriormente disminuyó su nivel hasta un valor menor pero aún por encima del basal, permaneciendo en ese nivel todo el tiempo que la CCK estaba actuando. La estimulación con concentraciones de CCK menores (30 pM) no produjo cambios detectables en la formación de IP₃. Tomado de: Physiology of The Gastrointestinal Tract; Stimulus-Secretion Coupling in the Pancreatic Acinus. Yule D.I. y Williams, J.A. pp 1447-1472.

Figura 7. Diagramas que muestran oscilaciones en la [Ca²⁺]_i en respuesta a la estimulación de células acinares pancreáticas de rata con bajas concentraciones de CCK (A, B y C). En D está representada la respuesta típica originada por la estimulación de estas mismas células con ACh (50 nM) en ratón. Tomado de: Physiology of The Gastrointestinal Tract; Stimulus-Secretion Coupling in the Pancreatic Acinus. Yule D.I. y Williams, J.A. pp 1447-1472.

Figura 8. Gráfico que muestra la formación de DG en células acinares pancreáticas estimuladas por CCK. Tomado de: Physiology of The Gastrointestinal Tract; Stimulus-Secretion Coupling in the Pancreatic Acinus. Yule D.I. y Williams, J.A. pp 1447-1472.

MÉTODOS

Tabla I. Composición del medio Krebs Ringer Hepes (KRH) empleado para el aislamiento de los acinos pancreáticos.

Tabla II. Composición del medio mix buffer empleado para el aislamiento de las células acinares pancreáticas.

Tabla III. Composición del medio MJJ empleado para la elaboración del medio Mix-Buffer empleado en el aislamiento de las células acinares pancreáticas..

Tabla IV. Composición del medio Na-Hepes empleado en la realización de los experimentos con células acinares pancreáticas aisladas.

Figura 1. Cambios en la fluorescencia emitida por fura-2 (2'5 μM) tras la realización de barridos (300-400 nm, emisión a 505 nm) de soluciones conteniendo

diferentes concentraciones de Ca^{2+} (Kit de Calibración de Calcio, Molecular Probes Inc.[®]).

Figura 2. Representación gráfica de los cambios en la fluorescencia emitida por fura-2 (eje de ordenadas) frente a las concentraciones de Ca^{2+} de las soluciones empleadas (eje de abscisas). Los valores han sido transformados y expresados en \log_{10} . El valor que adquiere la variable X cuando Y vale 0 corresponde a la Kd del fura-2 para el ion Ca^{2+} .

Figura 3. Cambios en la fluorescencia emitida por mag-fura-2 (2'5 μM) tras la realización de barridos (300-400 nm, emisión a 510 nm) de soluciones conteniendo diferentes concentraciones de Mg^{2+} .

Figura 4. Cambios en la fluorescencia emitida por mag-fura-2 (2'5 μM) tras la realización de barridos (300-400 nm, emisión a 510 nm) de soluciones conteniendo diferentes concentraciones de Ca^{2+} (Kit de Calibración de Calcio, Molecular Probes Inc.[®]).

Figura 5. Representación gráfica de los cambios en la fluorescencia emitida por mag-fura-2 (eje de ordenadas) frente a las concentraciones de Ca^{2+} de las soluciones empleadas (eje de abscisas). Los valores han sido transformados y expresados en \log_{10} . El valor que adquiere la variable X cuando Y vale 0 corresponde a la Kd del mag-fura-2 para el ion Ca^{2+} .

Figura 6. Esquema empleado para el seguimiento de la fluorescencia en células aisladas. Consta de una cámara de perfusión atemperada a 37°C mediante la recirculación de agua caliente a su alrededor. En su interior y sobre un cubreobjetos circular se depositan las células acinares pancreáticas, que se perfundirán con diferentes soluciones también atemperadas. El sistema de perfusión está colocado sobre la platina de un microscopio invertido de fluorescencia.

Figura 7. Representación gráfica de los cambios en la fluorescencia emitida por BCECF (eje de ordenadas) frente al pH de las soluciones empleadas (eje de abscisas), en la cubeta de un espectrofluorímetro modelo RF-5001-PC. Los valores de

fluorescencia se expresan como el ratio de la fluorescencia emitida a ambas longitudes de onda de excitación (490/440 nm).

Figura 8. Ejemplo de determinación de variaciones de pH_i en suspensiones acinares. **a**, período basal; **b**, adición a la cubeta de CCK-8 10^{-8} M; **c**, adición a la cubeta de NH_4Cl 20 mM.

Figura 9. Registro representativo de las variaciones obtenidas en los ratio de fluorescencia (490/440) en un experimento típico de calibración para pH_i . Las células acinares pancreáticas aisladas se perfundían sucesivamente con soluciones conteniendo (en mM): KCl (145), $MgCl_2$ (1), $CaCl_2$ (1), HEPES (10), D-glucosa (10) y nigericina a una concentración de 10 μ M. Estas soluciones eran tituladas a pH entre 6'4 y 8'0.

Figura 10. Curva de calibración utilizada para la transformación de los valores de fluorescencia de BCECF obtenidos, en valores reales de pH. Cada punto representa la media \pm EEM de 57 células en un total de 6 experimentos diferentes.

RESULTADOS

Tabla I. Variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en respuesta a la estimulación con ACh a las dosis de $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$. Los estímulos eran añadidos directamente a la cubeta a las concentraciones requeridas. Los resultados se expresan como la media más el error estándar de la media.

Tabla II. Variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en respuesta a la estimulación con histamina a las dosis de $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$. Los estímulos eran añadidos directamente a la cubeta a las concentraciones requeridas. Los resultados se expresan como la media más el error estándar de la media.

Tabla III. Variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en respuesta a la estimulación con 2-PEA a las dosis de $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$. Los estímulos eran añadidos directamente a la cubeta a las concentraciones requeridas. Los resultados se expresan como la media más el error estándar de la media.

Tabla IV. Variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en respuesta a la estimulación con dimaprit a las dosis de $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$. Los

estímulos eran añadidos directamente a la cubeta a las concentraciones requeridas. Los resultados se expresan como la media más el error estándar de la media.

Tabla V. Variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en respuesta a la estimulación con α -metilhistamina a las dosis de $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$. Los estímulos eran añadidos directamente a la cubeta a las concentraciones requeridas. Los resultados se expresan como la media más el error estándar de la media.

Tabla VI. Efecto que la estimulación con diferentes dosis de CCK-8 y ACh presenta sobre el pHi en las células acinares pancreáticas. Se indica la acidificación producida así como el número de células en que se obtuvo respuesta (***) $p < 0.005$ respecto al basal).

Tabla VII. Efecto que la aplicación de ionomicina y tapsigargina presenta sobre el pHi en las células acinares pancreáticas, así como el efecto que la entrada de Ca^{2+} presenta sobre el pHi tras el tratamiento con TPS (5 μM), CPZ (30 μM) y CCK-8 (10 nM). Salvo indicado, los experimentos se realizaron en medio libre de Ca^{2+} . Se indica el pHi basal y la acidificación producida (***) $p < 0.005$ respecto al basal).

Figura 1. Registros originales en los que se muestran los cambios producidos en la $[Ca^{2+}]_i$ en acinos pancreáticos de rata tras su estimulación con ACh $10^{-5}M$ (A), $10^{-6}M$ (B) y $10^{-7}M$ (C).

Figura 2. Registro típico que muestra la respuesta producida en la $[Ca^{2+}]_i$ tras la estimulación de las suspensiones acinares con CCK-8 $10^{-8}M$.

Figura 3. Ejemplo representativo del efecto observado en la respuesta de las células acinares pancreáticas a la adición de $10^{-5}M$ de ACh, a las que se les había administrado previamente histamina $10^{-5}M$.

Figura 4. Registros originales en los que se muestran los cambios producidos en la $[Mg^{2+}]_i$ en acinos pancreáticos de rata tras su estimulación con CCK-8 $10^{-8}M$ (a), ACh $10^{-5}M$ (b) e histamina $10^{-4}M$ (c) en un medio KRH conteniendo 1 mM de Mg^{2+} .

Figura 5. Conjunto de histogramas que muestran la $[Mg^{2+}]_i$ en diferentes momentos tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 $10^{-8}M$, ACh $10^{-5}M$.

5M e histamina 10^{-4}M en un medio KRH conteniendo 1 mM de Mg^{2+} . Los resultados se expresan como la media \pm EEM (* $p < 0.05$ con respecto al basal; $n=6$).

Figura 6. Registros originales en los que se muestran los cambios producidos en la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ en acinos pancreáticos de rata tras su estimulación con CCK-8 10^{-8}M (a), ACh 10^{-5}M (b) e histamina 10^{-4}M (c) en un medio KRH nominalmente libre de Mg^{2+} .

Figura 7. Conjunto de histogramas que muestran la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ en diferentes momentos tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 10^{-8}M , ACh 10^{-5}M e histamina 10^{-4}M en un medio KRH nominalmente libre de Mg^{2+} . Los resultados se expresan como la media \pm EEM (* $p < 0.05$ con respecto al basal; $n=5$).

Figura 8. Efecto de la estimulación con CCK-8 10^{-8}M (a) sobre la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ tras la adición previa de ACh 10^{-5}M (b) e histamina 10^{-4}M (c) a las suspensiones de células acinares pancreáticas.

Figura 9. Registros de la $[\text{Mg}^{2+}]_o$ en experimentos realizados con la sal tetrapotasio de mag-fura-2 ($2.5\ \mu\text{M}$) en presencia de Mg^{2+} 1 mM en el medio extracelular. Las suspensiones acinares se estimularon con CCK-8 10^{-8}M (a), ACh 10^{-5}M (b) e histamina 10^{-4}M (c).

Figura 10. Conjunto de histogramas que muestran la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ en diferentes momentos (120 s. y 300 s.) tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 10^{-8}M , ACh 10^{-5}M e histamina 10^{-4}M en medio KRH conteniendo 1 mM de Mg^{2+} . Los resultados representan la media en valor absoluto como incrementos sobre el basal \pm EEM de $[\text{Mg}^{2+}]_i$ ($n=5$).

Figura 11. Registros de la $[\text{Mg}^{2+}]_o$ en experimentos realizados con la sal tetrapotasio de mag-fura-2 ($2.5\ \mu\text{M}$) en ausencia de Mg^{2+} en el medio extracelular. Las suspensiones acinares se estimularon con CCK-8 10^{-8}M (a), ACh 10^{-5}M (b) e histamina 10^{-4}M (c).

Figura 12. Conjunto de histogramas que muestran la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ en diferentes momentos (120 s. y 300 s.) tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 10^{-8}M , ACh 10^{-5}M e histamina 10^{-4}M en un medio KRH nominalmente libre de Mg^{2+} .

Los resultados representan la media en valor absoluto como incrementos sobre el basal \pm EEM de la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ (n=5).

Figura 13. Registros en los que se muestran los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con CCK-8 10^{-8}M en medio conteniendo 1 mM de Ca^{2+} .

Figura 14. Registro que muestra los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con CCK-8 20 μM en medio conteniendo 1 mM de Ca^{2+} .

Figura 15. Registro que muestra los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con ACh 10 μM en medio conteniendo 1 mM de Ca^{2+} .

Figura 16. Registro que muestra los cambios producidos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (A) y en el pH_i (B) en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con ionomicina 1 μM en medio conteniendo 1 mM de Ca^{2+} . Representativo de 4 experimentos.

Figura 17. Registro que muestra los cambios producidos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (A) y en el pH_i (B) en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con ionomicina 1 μM en medio libre de Ca^{2+} . Representativo de 3 experimentos.

Figura 18. Registro que muestra los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con tpsigargina 5 μM en medio conteniendo 1 mM de Ca^{2+} .

Figura 19. Registros que muestran los cambios producidos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en medio libre de Ca^{2+} tras su estimulación con CCK-8 10^{-8}M (A), TPS 5 μM (B) y CPZ 30 μM (C), así como el efecto que presenta la reposición del ion Ca^{2+} en el medio extracelular.

Figura 20. Registros que muestran los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata cuando el medio de perfusión contenía CCK-8 10^{-8}M (A),

tapsigargina 5 μM (B) y ácido ciclopiazónico 30 μM (C) en medio libre de Ca^{2+} , seguido de un medio que contenía 5 mM de Ca^{2+} (representativos de 3 experimentos).

Figura 21. Registros que muestran los cambios producidos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con CCK-8 10^{-8}M en presencia (A) y ausencia de Ca^{2+} (B) en el medio de perfusión.

Figura 22. Registros en los que se muestran los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con CCK-8 10^{-8}M en medio libre de Ca^{2+} .

Figura 23. Registros que muestran los cambios producidos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata cuando se perfundían con un medio conteniendo tapsigargina 10 μM (A) y ácido ciclopiazónico 30 μM (B) en ausencia de Ca^{2+} . En las figuras también se muestra el efecto que presenta la posterior estimulación con CCK-8 10^{-8}M y la reposición de Ca^{2+} en el medio de perfusión.

Figura 24. Registros que muestran los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata cuando se perfundían con un medio conteniendo tapsigargina 5 μM (A) ó ácido ciclopiazónico 30 μM (B) en ausencia de Ca^{2+} (representativos de 3 experimentos). En las figuras también se muestra el efecto que presenta la posterior estimulación con CCK-8 10^{-8}M y la reposición de Ca^{2+} en el medio de perfusión.

Figura 25. Registros que muestran los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata cuando se perfundían con un medio conteniendo Cl_3La 1 mM (A) ó con un $\text{pH}_o = 8$ (B) y la respuesta a una posterior estimulación con CCK-8 10^{-8}M . En la soluciones no se añadió Ca^{2+} .

Figura 26. Registro que muestra el efecto producido sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata cuando se perfundían con un medio conteniendo TPA 10^{-7}M , seguida de la estimulación posterior con CCK-8 10^{-8}M .

Figura 27. Registro que muestra los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata cuando se perfundían con un medio conteniendo GFX 5 μM , seguido de CCK-8 10^{-8}M .

Figura 28. Registro que muestra el efecto que la modificación del volumen celular presenta sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata. Las células se perfundían con un medio hipertónico (210 mM ClNa) e hipotónico (70 mM ClNa).

Figura 29. Registro que muestra el efecto que la perfusión con un medio conteniendo 50 mM de ClK presenta sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata, seguido de la estimulación con CCK-8 10^{-8}M .

Figura 30. Registro que muestra el efecto que la supresión del ion Na^+ en el medio de perfusión (sustitución por NMDG) presenta sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata. En esta situación se sólo produce una pequeña respuesta tras la posterior estimulación con CCK-8 10^{-8}M .

Figura 31. Registro que muestra el efecto que la perfusión con un medio ácido ($\text{pH}_o = 7$) presenta sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata, seguida de la estimulación con CCK-8 10^{-8}M . Representativo de 3 experimentos.

Figura 32. Registro que muestra el efecto que la aplicación de un pulso de NH_4Cl 30 mM presenta sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata seguida de la perfusión de las células con CCK-8 10^{-8}M . Representativo de 3 experimentos.

Figura 33. Efecto de la perfusión de las células acinares pancreáticas con una solución 20 pM de CCK-8 sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Figura 34. Efecto de la perfusión de las células acinares pancreáticas con una solución 30 mM de NH_4Cl (A), 15 mM de propionato-Na (B) y NMDG (C) sobre el pH_i .

Figura 35. Efecto de la perfusión de las células acinares pancreáticas con una solución 30 mM de NH_4Cl , sobre el patrón oscilatorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la estimulación con CCK-8 20 pM.

Figura 36. Efecto de la perfusión de las células acinares pancreáticas con una solución 15 mM de propionato-Na, sobre el patrón oscilatorio de Ca^{2+} inducido por la estimulación con CCK-8 20 pM.

Figura 37. Efecto de la perfusión de las células acinares pancreáticas con un medio libre de Na^+ (sustituido por NMDG), sobre el patrón oscilatorio de Ca^{2+} inducido por la estimulación con CCK-8 20 pM.

Figura 38. Efecto de los cambios producidos en el pH_i sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en las células acinares pancreáticas perfundidas con un medio libre de Na^+ (sustituido por NMDG), en medio con y sin Ca^{2+} . En cada registro se muestra un control de movilización de Ca^{2+} con CCK-8 10^{-8}M (A) o CPZ 30 μM (B). Este registro es representativo de 4 experimentos.

Figura 39. Efecto de los cambios producidos en el pH_i sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en las células acinares pancreáticas perfundidas con propionato-Na 15 mM. Al final del experimento se aplicó un control de CCK-8 10^{-8}M .

Figura 40. Efecto de los cambios producidos en el pH_i sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en las células acinares pancreáticas perfundidas con NH_4Cl 30 mM en presencia (A) y ausencia (B) de Ca^{2+} en el medio de perfusión.

Figura 41. Efecto de la aplicación de un pulso de NH_4Cl 30 mM sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuando las células fueron tratadas previamente con un pulso de NH_4Cl en presencia (A) y ausencia (B) de este ion en el medio extracelular, y con ácido ciclopiazónico 30 μM (un inhibidor de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo) en ausencia de Ca^{2+} extracelular (C). Estos registros son representativos respectivamente de 4, 2 y 3 experimentos independientes.

Figura 42. Figura que muestra el efecto del tratamiento con propionato-Na 15 mM (A), NH_4Cl 30 mM (B) y ausencia de Na^+ en el medio de perfusión (sustitución de Na^+ por NMDG) (C) sobre la entrada de Ca^{2+} en células acinares pancreáticas previamente estimuladas por ácido ciclopiazónico 30 μM .

1.- INTRODUCCIÓN

La secreción de jugo pancreático, proceso que el laboratorio de Fisiología de la Facultad de Veterinaria en Cáceres viene estudiando desde su constitución en 1984, es el resultado fisiológico de la acción de un elevado número de mensajeros intercelulares (fundamentalmente hormonas gastrointestinales como secretina y CCK, y neurotransmisores como la acetilcolina y el VIP) que actúan como secretagogos sobre las células acinares y ductulares pancreáticas. Adicionalmente existen agentes reguladores que pueden modular la secreción, entre los que se incluyen histamina, somatostatina, insulina y factores de crecimiento.

El estudio amplio de los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción incluye generalmente observaciones acerca de los receptores de membrana, de los mensajeros intracelulares y de los efectores. En esta aproximación consideramos receptores a las proteínas que inician la respuesta celular tras la unión de los mensajeros intercelulares a su dominio extracelular, y que se localizan en la membrana plasmática basolateral. Los mensajeros intracelulares son moléculas informadoras bien de naturaleza fosfolipídica, o bien nucleótidos cíclicos e incluso iones. Los efectores son los sistemas que, al activarse por los mensajeros intracelulares, conducen a la fusión de los gránulos de zimógeno con la membrana plasmática luminal; pueden ser enzimas (proteínas cinasas, fosfatasas y adenosina trifosfatasas) o canales iónicos de membrana específicos.

El objetivo de este trabajo de investigación ha sido determinar el papel que juegan iones como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} , y el pH intracelular en la secreción pancreática estimulada por un secretagogo, la CCK, un neurotransmisor, la ACh, y un agente modulador como es la histamina, mensajeros intercelulares que se sabe utilizan la misma vía de acoplamiento, la vía del metabolismo de los inositoles fosfato de membrana asociado a calcio.

Para ello se han utilizado células acinares procedentes de páncreas de rata wistar, que se cargaban con biosondas fluorescentes sensibles a las concentraciones plasmáticas, tanto basales como en respuesta a los secretagogos citados, de Ca^{2+} y Mg^{2+} y al pH.

Previo al diseño experimental, se realizó una revisión bibliográfica del estado de la cuestión, que se fue actualizando a lo largo de los cuatro años dedicados a desarrollar nuestra Tesis. Esta revisión aparece en esta Memoria bajo el epígrafe “Antecedentes”.

Los métodos empleados se describen ampliamente a continuación, debido a la necesidad de una puesta a punto por primera vez en nuestro laboratorio. El resto de la memoria lo constituyen la exposición de los resultados obtenidos, la discusión de los mismos, así como un breve capítulo dedicado a las conclusiones.

2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El páncreas es una glándula túbuloacinar compuesta que está situada en la región craneal de la cavidad abdominal. Se localiza detrás del estómago y se extiende desde el bazo hasta las asas duodenales. El tejido pancreático está recubierto por una fina capa de tejido conectivo laxo del cual parten septos hacia el interior de la glándula dividiéndola en pequeños lóbulos.

El aporte sanguíneo del páncreas viene dado por las arterias celíaca y mesentérica craneal; de éstas parten ramas que se subdividirán en pequeños vasos que irrigan al tejido pancreático. El drenaje venoso está a cargo de pequeñas venas, satélites al sistema arterial y que desembocan en la vena porta y en la vena esplénica (Bockman, 1986; Gorelick y Jamieson, 1987).

El conducto por el que se excretan los productos de secreción elaborados por las células pancreáticas en la rata, el conducto pancreático-biliar común, se extiende a lo largo de la glándula, desembocando en él los conductos interlobulares que proceden de unas unidades que reciben el nombre de lóbulos pancreáticos. Estos conductos interlobulares son el resultado de la reunión de unidades más pequeñas que son los conductos intralobulares y que reciben el contenido que los acinos pancreáticos han vertido a los conductos intercalares; éstos últimos se comunican directamente con la luz del acino pancreático. Así, el árbol que forman los conductos pancreáticos y que sólo representan un 2% del volumen total del páncreas de la rata (Githens, 1988), desempeña un papel de soporte estructural del tejido pancreático, además de su función de conducción de las secreciones enzimática y fluida al duodeno.

El páncreas es una glándula mixta, constituida por una porción endocrina y una exocrina, la cual representa la mayor parte del tejido (84%). Los conductos pancreáticos y vasos sanguíneos representan el 4% del volumen total del páncreas, mientras que la porción endocrina constituye tan sólo el 2% aproximadamente. El resto, un 10%, lo constituye la matriz extracelular (Gorelick y Jamieson, 1987). Las funciones exocrina y endocrina las llevan a cabo diferentes grupos de células. Las enzimas digestivas y el jugo pancreático son elaborados en las células acinares y ductulares respectivamente y llegan al duodeno a través del conducto pancreático, donde participarán en las etapas finales de la hidrólisis de proteínas, grasas y carbohidratos (Susumu, 1977; Kern, 1986).

Los conductos pancreáticos, además de constituir el sistema de conducción de las enzimas digestivas, participan en la elaboración del jugo pancreático, contribuyendo con el componente fluido y electrolitos a la formación del mismo (Schulz, 1981; Case y Argent, 1989).

La porción endocrina del páncreas está constituida por los islotes de Langerhans y se encarga de la fabricación de hormonas que van a participar en el metabolismo de los hidratos de carbono. Estos islotes son grupos de células que están distribuidos por todo el tejido pancreático y rodeados por las células exocrinas (Chey, 1986) y los productos por ellos elaborados entran en la circulación sanguínea.

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que el páncreas exocrino está organizado en verdaderas unidades acinares, y cuando se habla de estructura pancreática nos referimos a esta organización, hay estudios recientes que cuestionan este concepto y sugieren que la unidad funcional del páncreas es, tanto desde el punto de vista morfológico (Brockman, 1978; Akao y cols., 1986) como desde el punto de vista del acoplamiento eléctrico (Petersen, 1982), de mayor tamaño que el acino de 20 a 50 células que se había venido considerando tradicionalmente. La comunicación existente entre las células del páncreas, por medio de las uniones intercelulares o “gap junctions”, permite que las señales que se han originado en una célula se propaguen al resto de la población celular. La ventaja de este fenómeno es la posibilidad de que se generen respuestas secretoras mayores que si solamente se estimulase un número limitado de células acinares.

2.1.- El acino pancreático.

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

La mayoría de las células en el acino la constituye las células acinares, existiendo un número reducido de las denominadas células centroacinares que marcan el comienzo

del sistema de conducción de la glándula. Al microscopio óptico las células acinares presentan una forma piramidal con el vértice dirigido hacia la luz del acino.

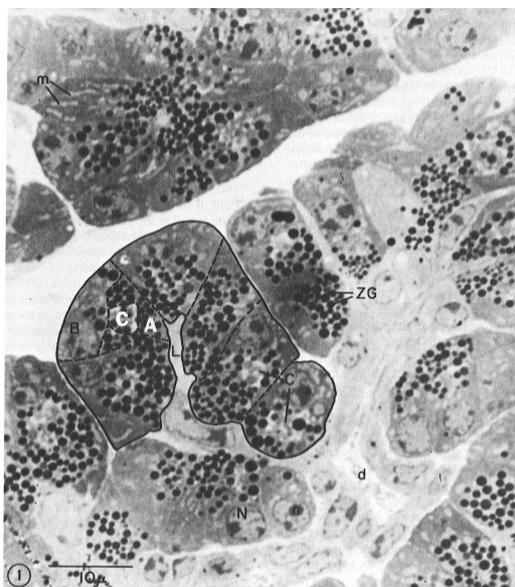


Figura 1. Micrografía de una sección de páncreas de cobaya que muestra la estructura de un acino. En la misma se puede observar el polo apical de las células acinares, rico en gránulos de zimógeno, y el polo basolateral, conteniendo el RE. Tomado de: *Physiology of The Gastrointestinal Tract; The Pancreatic Acinar Cell: Structure-Function Relationships.* Gorelick F.S. y Jamieson, J.D. pp 1353-1376.

Dentro de la célula acinar existe un cierto grado de especialización. Los gránulos de zimógeno se localizan en el polo apical del citoplasma y su número varía en función del grado de desarrollo (Doyle y Jamieson, 1978) y el grado de estimulación por los agentes neurohormonales. En el área existente entre el núcleo de la célula, que está situado en el polo basal, y el polo apical, que es la zona en la que se distribuye el complejo de Golgi, tiene un aspecto pálido cuando se observa al microscopio óptico. Finalmente existe una tercera zona que se caracteriza por ser intensamente basófila y que se localiza en la región basal de la célula, estando ocupada por el retículo endoplasmático rugoso (RER). En el citoplasma también encontramos mitocondrias que en ocasiones están “secuestradas” entre los elementos que forman el retículo y a lo largo de la membrana celular. Algunas de las vacuolas del complejo de Golgi contienen un material de densidad intermedia, mientras que existen otras con un contenido similar al de los gránulos de zimógeno; estos elementos se denominan vacuolas de condensación que están en estadios de transición dentro del proceso de formación de los gránulos de zimógeno. En la figura 1 se detalla una micrografía realizada a un segmento del páncreas de un cobaya, donde se muestra un acino pancreático.

2.2.- La célula centroacinar.

La porción terminal del conducto intercalar de un acino se prolonga dentro del mismo de manera que algunas células ductulares se aplanan y se interponen entre algunas células acinares dentro del lumen acinar. Estas células ductulares localizadas dentro del acino se denominan centroacinares (Susumu, 1977; Copenhaver y cols., 1987). Se trata de células de tamaño inferior al de las células acinares (Ekholm y cols., 1962) que presentan una reducida cantidad de citoplasma y ausencia relativa de gránulos de zimógeno, un pequeño complejo de Golgi y un reducido número de cisternas de RER. Las mitocondrias son grandes y abundantes y tienden a ser elongadas. Tras la realización de distintos estudios se ha aceptado que su función es la de participar en la secreción fluida y de electrolitos (Githens y cols., 1992).

2.3.- Los conductos pancreáticos.

Los conductos pancreáticos son un sistema ramificado de tubos a lo largo y ancho de toda la glándula y terminan en las asociaciones de células exocrinas que hemos

denominado acinos pancreáticos. Solamente representan el 2% del volumen total del páncreas y presentan tres funciones principales:

- soporte estructural para la porción acinar.
- sistema de conducción de las enzimas digestivas y demás componentes secretados por las células acinares (Case y Argent, 1989).
- representan la porción responsable de la secreción de bicarbonato y otros iones y fluido (Schulz, 1981).

La estructura de las células ductulares es bastante similar a la de las células centroacinares, pero a diferencia de las células acinares su citoplasma aparece como vacío, con pocas mitocondrias, un pequeño complejo de Golgi y una pequeña cantidad de RER. Finalmente, mientras que la membrana lateral de las células centroacinares es prácticamente lisa, las células de los conductos intralobulares presentan interdigitaciones (Kern, 1986). En la figura 2 se muestra un diagrama esquemático del árbol que forman los conductos pancreáticos, así como una micrografía al microscopio electrónico de un lóbulo pancreático donde se puede apreciar la disposición de estos conductos.

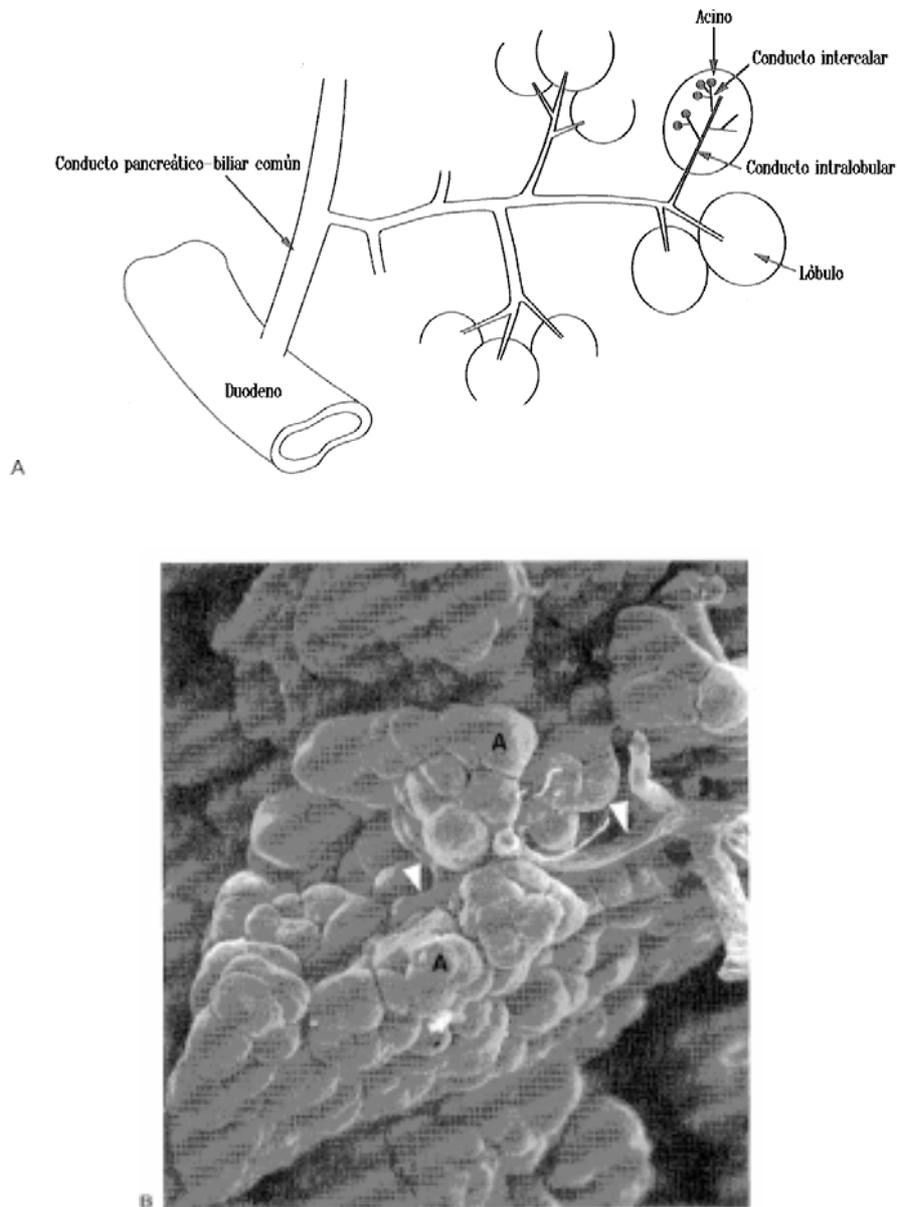


Figura 2. A. Esquema que muestra el árbol formado por los conductos pancreáticos en la rata, ratón y hámster. B. Micrografía al microscopio electrónico que muestra una imagen de un lóbulo pancreático (A) con sus conductos intercalados (flecha). Tomado de: Physiology of The Gastrointestinal Tract; Pancreatic Ducts: Cellular Mechanism and Control of Bicarbonate Secretion. Argent, B.E. y Case, R.M. pp 1473-1497.

2.4.- Control de la secreción pancreática exocrina.

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

2.4.1.- Control nervioso.

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

Su inervación es compleja, recibiendo aferencias nerviosas de distinto origen y tipo. Las fibras nerviosas que inervan el páncreas son fundamentalmente parasimpáticas (Richens, 1945; Holst, 1986) pero también, aunque en menor medida, recibe fibras nerviosas simpáticas (Pearson y Singh, 1983; Pearson, y cols., 1984). Estas aferencias constituyen fibras procedentes del nervio vago y de los nervios espláncnicos. Los lugares en que se localizan las terminaciones nerviosas pueden concretarse en vasos sanguíneos, células acinares pancreáticas, células ductulares e islotes de Langerhans.

2.4.1.1.- Colinérgico.

Numerosos estudios “in vivo” han revelado la importancia de la actuación de agentes colinérgicos sobre la secreción pancreática exocrina. El nervio vago es el principal elemento colinérgico que actúa sobre esta glándula. Debas y Yamagishi (1978) revelaron que existen arcos reflejos que conectan el antro del estómago con el páncreas. La sección del tronco del vago y la administración de atropina reducen e inhiben, respectivamente, la secreción de proteínas y bicarbonato. Pero este fenómeno varía de

unas especies animales a otras, existiendo diferente sensibilidad a la administración de atropina (Case y Argent, 1989) y también diferencias en cuanto a la mayor ó menor concentración de proteínas y bicarbonato en la secreción producida ante el estímulo vagal (Salido y cols., 1982). En otros estudios, realizados en ratas anestesiadas, la estimulación eléctrica del nervio vago induce la secreción de proteínas de una manera similar a como lo produce la estimulación por colecistocinina (CCK) (Camello y cols., 1993).

La importancia del sistema nervioso parasimpático en el control de la secreción pancreática exocrina se refleja en la localización de receptores muscarínicos en las células acinares. Estos parecen dividirse en la rata en dos clases, una de alta afinidad (aproximadamente del orden de micromolar $-\mu\text{M}-$) y otra de baja afinidad (unas 10 veces menor) (Larose y cols., 1981; Williams y cols., 1989). Se cree que los receptores son del tipo denominado M2 (Louis y Owyang, 1986).

2.4.1.2.- Adrenérgico.

Además de la actuación de fibras nerviosas colinérgicas sobre el páncreas exocrino se ha descrito otro tipo de inervación de la glándula y que corre a cargo de factores catecolaminérgicos. Diferentes autores han revelado que la sección de los nervios espláncnicos conduce a un incremento en la secreción, mientras que su estimulación la inhibe (Holst, 1986; Solomon, 1987; Walsh, 1987). Por tanto se acepta que estas fibras nerviosas tienen un efecto fundamentalmente inhibitorio.

En condiciones de estrés, la secreción del factor de liberación de corticotropina en el sistema nervioso central (SNC) estimula las fibras nerviosas simpáticas y conducen a la liberación de norepinefrina (Lenz y cols., 1992; Messmer y cols., 1993), y en consecuencia se produce una disminución en la secreción pancreática. Este fenómeno es probablemente debido a una reducción en el flujo sanguíneo aportado a la glándula, ya que estudios histoquímicos han revelado la presencia de terminaciones adrenérgicas predominantemente asociadas a las estructuras vasculares del páncreas.

Sin embargo, la administración de agonistas adrenérgicos ha conducido a la obtención de resultados muy dispares. Algunos investigadores no encuentran efecto

alguno (Kanishi y cols., 1990), mientras que otros atribuyen a los receptores α_1 un papel inhibitorio (Varga y cols., 1990) y a los β_1 un efecto estimulador, efecto que se ha postulado podría estar mediado por la vía de la adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPC) (Pearson y cols., 1984; De Dios y cols., 1987). Estos y otros estudios han puesto de manifiesto el papel potencial del sistema nervioso simpático sobre la regulación de la secreción pancreática pudiendo influir tanto la secreción fluida como la de enzimas (Pearson y cols., 1984).

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

2.4.1.3.- Inervación peptidérgica.

Junto con la inervación del sistema nervioso simpático y parasimpático existen evidencias acerca de la presencia de fibras nerviosas peptidérgicas que podrían participar en el control de la secreción pancreática exocrina. Entre los péptidos que se ha sugerido que presentan acciones sobre la secreción pancreática se encuentra la somatostatina, encefalina, péptido intestinal vasoactivo (VIP) o sustancia P (Dockray, 1987) y su acción parece ser más bien indirecta; así por ejemplo la encefalina inhibe la secreción modulando las rutas colinérgicas (Louie y cols., 1988) o la liberación de secretina como es el caso de la somatostatina (Kuvshinoff y cols., 1993).

2.4.2.- Control humoral.

Se ha considerado a la secretina y a la CCK como las principales hormonas que regulan las respuestas del páncreas exocrino a la comida. La llegada del contenido ácido gástrico (quimo) al duodeno conduce a la liberación de estas hormonas por parte de células especializadas del sistema APUD que se localizan en la mucosa duodenal (Chey, 1986).

2.4.2.1.- Secretina y péptidos relacionados.

Esta hormona intestinal constituye el más potente y eficaz agente estimulador del flujo pancreático y de la secreción de bicarbonato en todas las especies en que se ha

probado. En el organismo existe un grupo de hormonas peptídicas con homología estructural similar, lo que ha dado lugar a la denominada familia de la secretina, constituida por secretina, VIP, glucagón y péptido histidina-isoleucina (PHI).

La secretina es un péptido que presenta dos formas moleculares (27 y 30 aminoácidos) y está presente en el sistema nervioso y en las células endocrinas del duodeno y yeyuno (O'Donohue y cols., 1981). Este péptido se aisló y caracterizó en segmentos proximales del intestino delgado del cerdo (Jorpes y Mutt, 1961; 1962).

Los estímulos para su liberación a la circulación sanguínea general durante el proceso de digestión son los ácidos y álcalis (García, 1989), los productos de hidrólisis de las grasas (Tranberg y cols., 1985) y la bilis (Hansen, 1980). La secretina actúa sobre el páncreas exocrino produciendo principalmente un incremento en la secreción fluida y en la de enzimas, presentando estas dos respuestas diferencias interespecíficas (Case y Argent, 1989). Se ha aceptado que sus efectos fundamentalmente se presentan sobre las células ductulares y en menor medida sobre las células acinares pancreáticas, conduciendo al incremento en los niveles citoplasmáticos de adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPC) (Jensen y Gardner, 1981). En estas últimas, las células acinares pancreáticas, se han descrito varios receptores para esta hormona. En el caso de la rata se ha llegado a describir hasta 4 tipos de receptores con diferente afinidad (Bissonnette y cols., 1984). Igualmente las células ductulares pancreáticas presentan receptores para esta hormona (Case, 1978).

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un péptido constituido por 28 aminoácidos que está presente en intestino, páncreas, glándulas salivales y sistemas nerviosos central y periférico (Dockray, 1987). Los factores que están implicados en su liberación parecen ser principalmente impulsos nerviosos, constituyendo un importante factor en la respuesta vagal de algunas especies como el cerdo (Chey, 1986). También puede ser liberado en respuesta a algunos productos de la digestión (Schaffalitzky y cols., 1977). Sus acciones se concretan en un efecto vasodilatador periférico y, en el páncreas exocrino, producir una respuesta secretora tanto de la fracción fluida del jugo pancreático como de la enzimática (Gardner y Jensen, 1987). Sus receptores se localizan en la membrana celular y puede unirse también a los de la secretina, aumentando la

secreción de enzimas a través de una elevación en el nivel de AMPc intracelular (Williams y cols., 1989; Swandito y cols., 1989).

El glucagón es una hormona implicada en el metabolismo de los hidratos de carbono y es secretado por las células a de los islotes de Langerhans. Se ha encontrado que la administración de grandes dosis de glucagón inhibe la secreción pancreática inducida por la comida o por la perfusión intestinal de aminoácidos o ácido clorhídrico (Pincus y cols., 1948). En otros estudios sus efectos se concretaban en la inhibición tanto de la secreción pancreática de fluidos como de enzimas estimulada por secretina o CCK (Kato y cols., 1983; Chey, 1986).

El péptido histidina-isoleucina (PHI) presenta sobre la secreción pancreática efectos similares a los del VIP (Holst, 1986; Dockray, 1987) y se distribuye por neuronas en las que también se localiza el VIP. Se une también a su mismo receptor, si bien con menor afinidad (Williams y cols., 1989).

2.4.2.2.- Colecistocinina (CCK).

La CCK es un péptido originariamente aislado y purificado en intestino delgado de cerdo. Es una hormona de la que se han descrito numerosos tipos moleculares (8, 12, 21, 33, 39 y 58 amino ácidos) y se localiza en células distribuidas por todo el intestino delgado y neuronas del sistema nervioso central y periférico (Walsh, 1987). En estudios posteriores se puso de manifiesto que una parte de su molécula, el heptapéptido C-terminal, poseía por completo la actividad biológica de la hormona y que el octapéptido C-terminal, por sí mismo, tenía una eficacia diez veces más potente que la CCK (Jensen y cols., 1980).

Sus efectos sobre el páncreas exocrino se resumen en provocar fundamentalmente un incremento en la secreción de enzimas, presentando algunas diferencias interespecíficas en cuanto a su capacidad de estimular la secreción de hidromineral: mientras que en la rata hay una clara respuesta en la secreción fluida, en el gato es casi nula (Case y Argent, 1989). Además presenta otras acciones entre las que se encuentran promover alteraciones en la síntesis de proteínas (Perkins y cols., 1991), efectos tróficos (Gasslander y cols., 1990) y, a concentraciones elevadas, puede estimular la adenilato

ciclasa (AC) pancreática (Gardner y Jensen, 1981), elevando la concentración de AMPc (Gardner y cols., 1983).

Las respuestas pancreáticas a la CCK se deben a la presencia de receptores de membrana de los cuales se han descubierto al menos dos tipos, existiendo datos que permiten adelantar la existencia de al menos un tercer tipo (Yu y cols., 1990; Menozzi y cols., 1991). Un tipo de receptor tiene una alta afinidad por la hormona (del orden de picomolar), pero su capacidad total de unión es menor que la del otro tipo, que presenta en cambio una afinidad bastante baja (del orden de nanomolar) (Lee y cols., 1987; Williams y cols., 1989; Menozzi y cols., 1991).

La CCK actúa en las células acinares pancreáticas activando la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP₂) de membrana, conduciendo a la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) que va a movilizar el calcio (Ca²⁺) intracelular (Putney, 1988; Berridge e Irvine, 1989). Esta ruta intracelular es la que se considera ligada a la activación de los receptores de alta afinidad, mientras que los de baja afinidad podrían participar en la aparición de respuestas observadas a dosis no fisiológicas (“inhibición” de la secreción a dosis supramáximas, incremento en la captación de glucosa, estímulo de la AC,...) (Williams y cols., 1989). Esta idea se ha visto reforzada con el uso de análogos sintéticos de la CCK, que tienen la capacidad de unirse a los receptores de alta afinidad, funcionando como antagonistas de los de baja afinidad. Estos compuestos (JMV-180 y Boc[Nle28-Nle31]-CCK-7) han demostrado ser estimulantes de la secreción enzimática y de cambios en la concentración de calcio libre citoplasmático ([Ca²⁺]_i) similares a los obtenidos con dosis fisiológicas de CCK (Matozaki y cols., 1990; Lignon y cols., 1990).

Existe un péptido con semejanza estructural similar a la CCK que es la gastrina (presentan en común el mismo octapéptido C-terminal). Este péptido está presente en el intestino delgado, además de en las células G del antro pilórico (Walsh, 1987). Sus efectos sobre la secreción pancreática exocrina son similares a los de la CCK, pero presenta menor potencia (Stening y Grossman, 1969). Los receptores a los que se une son los mismos que los de la CCK, pero con una afinidad 1000 veces menor (Gardner y Jensen, 1987).

2.4.2.3.- Otras hormonas y factores reguladores.

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

La bombesina es un péptido que se aisló inicialmente de la piel de los anfibios y tiene en los mamíferos análogos estructurales (como el “gastrin releasing peptide” o GRP) distribuidos por neuronas y células endocrinas del sistema gastrointestinal, entre ellas fibras nerviosas intrapancreáticas (Solomon, 1987). En las células acinares pancreáticas se han descrito receptores para este péptido con una afinidad del orden de nanomolar (Williams y cols., 1989). En la rata y otras especies el GRP tiene efectos estimuladores sobre la secreción enzimática, debido en parte a su capacidad liberadora de gastrina (Solomon 1987).

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

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

El polipéptido pancreático (PP), el neuropéptido Y y el péptido YY son un grupo de agentes inhibidores de la secreción pancreática con estructura similar y que están

presentes en el páncreas, cerebro y neuronas intestinales respectivamente (Dockray, 1987; Walsh, 1987). Se liberan en respuesta a los productos de la digestión de los lípidos en el intestino.

La somatostatina también es una hormona reguladora de la secreción pancreática. Sus niveles plasmáticos se incrementan tras la ingestión de alimento (Layer y cols., 1993). Presente, además de en el hipotálamo, en las células D del intestino y en los islotes de Langerhans, y en neuronas del sistema nervioso periférico (Walsh, 1987), posee receptores en la membrana de las células acinares pancreáticas (Taparel y cols., 1985). Su efecto sobre el páncreas exocrino es la inhibición de los componentes fluido y enzimático de la secreción en respuesta a distintos secretagogos como la CCK o la secretina, además de inhibir la secreción de estos péptidos (Solomon, 1987; Shiratori y cols., 1991).

En las células acinares de cobaya se han descrito receptores para la sustancia P, que está presente en el intestino y en otros tejidos. Presenta efectos estimuladores de la secreción pancreática (Gardner y Jensen, 1987). Además de poder unirse a los receptores de la bombesina, parece inhibir competitivamente las respuestas a la CCK y a la secretina (Sjödín, 1985). Su efecto estimulante está asociado a la movilización del calcio intracelular (Gardner y Jensen, 1987).

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

Debido a que en la masa pancreática se exocrina se entremezclan las células de la porción endocrina, existe una gran controversia respecto al efecto que la insulina podría presentar sobre la secreción pancreática exocrina. Bruzzone y cols., (1984) han observado que la insulina inhibe la secreción basal y la estimulada por ceruleína en el páncreas perfundido de rata. Sin embargo Kanno y Saito (1976) demostraron en la misma especie que la insulina potencia la acción de la CCK sobre la secreción de amilasa tanto “in vivo” como “in vitro”. Singh en 1985 comunicó que la insulina no

afecta a la secreción basal en segmentos pancreáticos de ratón, pero sí potencia la secreción estimulada por ACh.

La histamina es otro factor que ha demostrado presentar actividad secretagoga sobre el páncreas exocrino. Se trata de una hormona paracrina ampliamente distribuida en el tracto gastrointestinal de varias especies animales, incluido el hombre (Lorenz y col., 1969, 1973), y es liberada en altas concentraciones en el jugo pancreático tras la estimulación de la glándula (Lorenz y col., 1968), presentando efectos secretagogos sobre el páncreas de varias especies tanto “in-vivo” como “in-vitro” (Tankel y col., 1957; Iwatsuki y col., 1981; Pariente y col., 1989; Alcón y col., 1995; Lajas y col., 1995). A pesar de sus efectos secretagogos sobre el páncreas exocrino, sus mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción aún no están totalmente clarificados (Pariente y col., 1991; Murillo y col., 1992; Lajas y col., 1995). Este efecto estimulador parece estar ligado a los receptores H1, mientras que la activación de los H2 tiene resultados inhibidores (Pariente y cols., 1990a; 1990b; 1991).

Estudios realizados en diferentes tipos celulares han demostrado que la activación de los receptores tipo H1 de la histamina conducen a un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ como se ha descrito en células endoteliales (Diarra y Sauvé, 1992) o en células de médula adrenal de rata (Warashina 1992). De igual manera se han descrito acciones de la histamina mediadas a través de la vía del AMPc, en estudios realizados sobre células gástricas de cobaya (Cheret y col., 1984), hombre (Sarem-Aslani y col., 1992), en cultivos celulares de cerebro de rata (Agulló y col., 1990) y en glándula submandibular de cobaya (Saeki y col., 1981).

Los factores de crecimiento son polipéptidos que participan en la regulación de procesos como el crecimiento, la replicación y la diferenciación celular. Su presencia en la circulación sistémica les permite actuar como reguladores del metabolismo celular. También podrían actuar localmente como reguladores (autocrinos o paracrinos) de las funciones celulares (Canalis, 1992).

Por lo general, la interacción de los factores de crecimiento con sus receptores conduce a la activación de la vía de las tirosinas cinasas (Carpenter, 1987) desencadenando toda una serie de reacciones en cadena que van a resultar en la

estimulación del intercambiador Na^+/H^+ , la estimulación de la fosfolipasa C y una elevación en la concentración de Ca^{2+} libre citoplasmático. También se ha encontrado una elevación en los niveles de calmodulina activada en respuesta a la movilización de Ca^{2+} , proceso que coincide temporalmente con los procesos previos a la síntesis de ADN (Chafouleas y cols., 1984). Los factores de crecimiento también estimulan cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) (Saltiel y Ohmichi, 1993; Reddy, 1994).

Está bien establecido que el factor de crecimiento epidermal (EGF), el “insulin-like growth factor” (IGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) desempeñan importantes papeles en los procesos de proliferación y diferenciación celular (Mossner y cols., 1985; Ponnysegur y cols., 1985; Iwashita y Kobayashi, 1992), pero las respuestas del páncreas exocrino a los factores de crecimiento no son muy claras. En diversos estudios se ha descrito la existencia de receptores para factores de crecimiento en las células acinares pancreáticas, cuya activación podría conducir a la secreción de amilasa, probablemente en relación con la vía del Ca^{2+} intracelular (Logsdon y Williams, 1983; Chandrasekar y Kork, 1991; Stryjek-Kaminska y cols., 1993; Lajas y cols., 1996).

El aumento en la actividad de las tirosina cinasas celulares podría interactuar con otras cinasas implicadas en las vías clásicas de acoplamiento estímulo-secreción (vía del AMPc y vía Ca^{2+} -inositoles fosfato). A pesar de que no se ha demostrado que la vía de la tirosina cinasa esté implicada directamente en la vía del AMPc, existen evidencias experimentales sobre el hecho de que tirosina cinasa y AMPc actúan sinérgica y competitivamente en varias respuestas celulares (Iwashita y Kobayashi, 1992) y, por otro lado, el incremento en la actividad tirosina cinasa induce un aumento en la producción de fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4-P) (Conway y cols., 1991). Así pues, previsiblemente los factores de crecimiento y otras sustancias con actividad tirosina cinasa podrían modular las respuestas del páncreas exocrino a secretagogos que actúen por diferentes vías de acoplamiento estímulo-secreción e incluso podrían promover por sí mismas secreción de jugo pancreático, hechos que en este momento no están muy claros.

2.5- Acoplamiento estímulo-secreción en el páncreas exocrino.

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

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

Utilizando la secreción de amilasa para el estudio de las respuestas en preparaciones de células acinares, tras la administración de agonistas y antagonistas, se ha podido detectar la presencia de receptores específicos en las células acinares pancreáticas. Estas indagaciones han sido confirmadas por estudios que emplearon estos ligandos pero marcados radiactivamente. Las células acinares de distintas especies presentan en su membrana receptores para las hormonas CCK y secretina y neurotransmisores como noradrenalina, VIP y especialmente ACh (Case, 1984; Schulz y Stolce, 1980; Pearson y cols., 1981; Petersen, 1982; Singh y Pearson, 1984; Williams,

1984; Williams. y Hootman, 1986; Case y Argent, 1989). También se han descrito receptores para otros péptidos como la bombesina (GRP) (Deschodt-Lanckman y cols., 1976; Ashton y cols., 1990; 1991) y la sustancia P (Jensen y Gardner, 1987; Ashton y cols., 1990), los cuales pueden actuar como secretagogos aunque su significado fisiológico está menos claro.

Existen otros factores que podrían modular la secreción pancreática como la insulina, el factor epidermal de crecimiento (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la somatostatina (Jensen y Gardner, 1981; Singh, 1983; Hootman y Williams, 1987). Estos agentes interactúan inicialmente con sus receptores específicos localizados en la membrana celular (Gardner y Jensen, 1986).

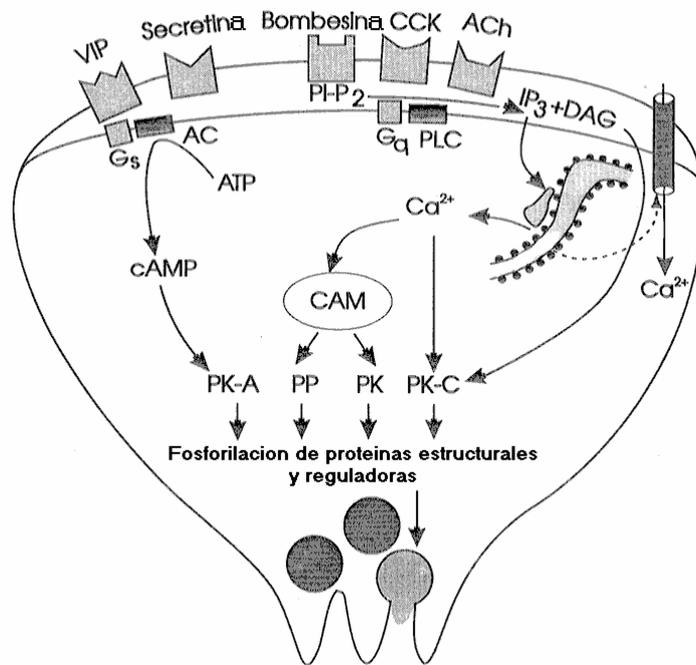


Figura 3. Esquema de los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción en el páncreas exocrino. Tomado de: *Physiology of The Gastrointestinal Tract; Stimulus-Secretion Coupling in the Pancreatic Acinus.* Yule D.I. y Williams, J.A. pp 1447-1472.

Todos estos receptores, salvo los de la insulina y los factores de crecimiento, pertenecen a una familia caracterizada estructuralmente por la presencia de siete dominios hidrofóbicos localizados en el espesor de la membrana celular y, funcionalmente, por su interacción con proteínas ligadoras de nucleótidos de guanina (proteínas G) (Wess y cols., 1990; Houslay, 1992). Los segmentos así localizados en la membrana celular pueden formar un bolsillo para la unión de moléculas pequeñas como la ACh, mientras que los extremos amino y los bucles externos pueden ser también importantes cuando interaccionan con los diferentes péptidos. El bucle citoplasmático que se proyecta entre los dominios quinto y sexto se cree que interacciona con la proteína G apropiada, mientras que los residuos de treonina y serina, localizados en el extremo carboxilo terminal y que pueden ser fosforilados, podrían estar implicados en procesos de regulación del receptor tales como desensibilización y “down-regulation”. En la figura 3 se detalla una representación esquemática de los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción en las células acinares pancreáticas.

2.5.1.- Señales de transmembrana.

2.5.1.1.- Proteínas G.

Los receptores de los secretagogos en las células pancreáticas son los encargados de llevar una información hacia el interior celular mediante la interacción con heterotrímeros ligadores de GTP, las proteínas G. Estas proteínas se localizan en la cara interna de la membrana plasmática y están constituidas por tres subunidades denominadas α , β y γ . Las dos últimas normalmente se presentan como complejo $\beta\gamma$ (Birnbauer, 1990; Simon y cols., 1991).

Su descubrimiento tuvo lugar a lo largo de la década de los años 70, en el transcurso de las investigaciones que trataban de profundizar en el conocimiento de la vía del AMPc. Las proteínas G comunican la activación del receptor de membrana a la adenilato ciclasa (AC), incrementando su actividad para aumentar la concentración de AMPc en el citoplasma. Tras los descubrimientos iniciales, se encontraron proteínas G implicadas en el proceso de inhibición de la vía del AMPc ejercido por algunos receptores. Así, las proteínas G que regulan la AC se han clasificado en estimulantes (G_s) e inhibitoras (G_i), basándose en la existencia de diferentes subunidades α , α_s y α_i ,

que pueden también ser distinguidas sobre la base de su sensibilidad a las toxinas del cólera y pertusis. Estas toxinas actúan catalizando la ribosilación (ADP-ribosilation) de las subunidades a_s y a_i respectivamente.

Tras ello se fueron clasificando, desde un punto de vista funcional y bioquímico, en distintos tipos (transducina o G_t , G_o , G_i , G_p o G_q , G_s ,...) (Spiegel, 1990). Con el clonaje de genes se han descubierto diferentes tipos de cada una de las tres subunidades (α , β y γ) que pueden formar diferentes combinaciones (las subunidades β y γ , con una alta homología, se combinan con distintas subunidades α , que le dan la “identidad” a la proteína G) (Kaziro, 1990). Así, es posible que en una misma célula se expresen varios genes, originando una serie de distintas proteínas G que modulen la respuesta a distintos receptores. Además, un mismo receptor puede funcionar con más de una proteína G (cada una con una misión distinta) y viceversa, una proteína G puede estar asociada a más de un receptor y/o respuesta celular (Birnbaumer, 1990).

Estudios recientes han permitido avanzar en el conocimiento que se tiene sobre la subunidad α ; se han podido clonar hasta 30 cDNAs (Simon y cols., 1991). En función de su homología estructural se dividen en diferentes clases: la familia de las G_s , que contiene a las G olfatorias; la familia de las G_i , que contiene a las G_o y una proteína G muy abundante en el cerebro; y una familia nueva que se ha denominado G_q y que comprende dos miembros llamados $G\alpha_q$ y $G\alpha_{11}$, que están ampliamente distribuidos y carecen de un lugar sensible a la toxina pertusis (Strathmann y Simon, 1990).

Las proteínas G mejor estudiadas hasta la fecha son la G_s (activadora de la AC), G_i (inhibidora de la AC), transducina (activadora de la fosfodiesterasa de GMPC) y G_o (cuya función aún no se conoce exactamente).

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

presencia de actividad GTPasa intrínseca de este complejo, el GTP se hidroliza a GDP con lo que la subunidad α ahora inactiva se reasocia al complejo $\beta\gamma$ terminando su activación (Cockroft y Stutchfield, 1988). Así, es la subunidad α la que reconoce al efector. En la figura 4 se representa esquemáticamente el mecanismo propuesto para la regulación de la actividad de la adenilato ciclasa a través de las proteínas G.

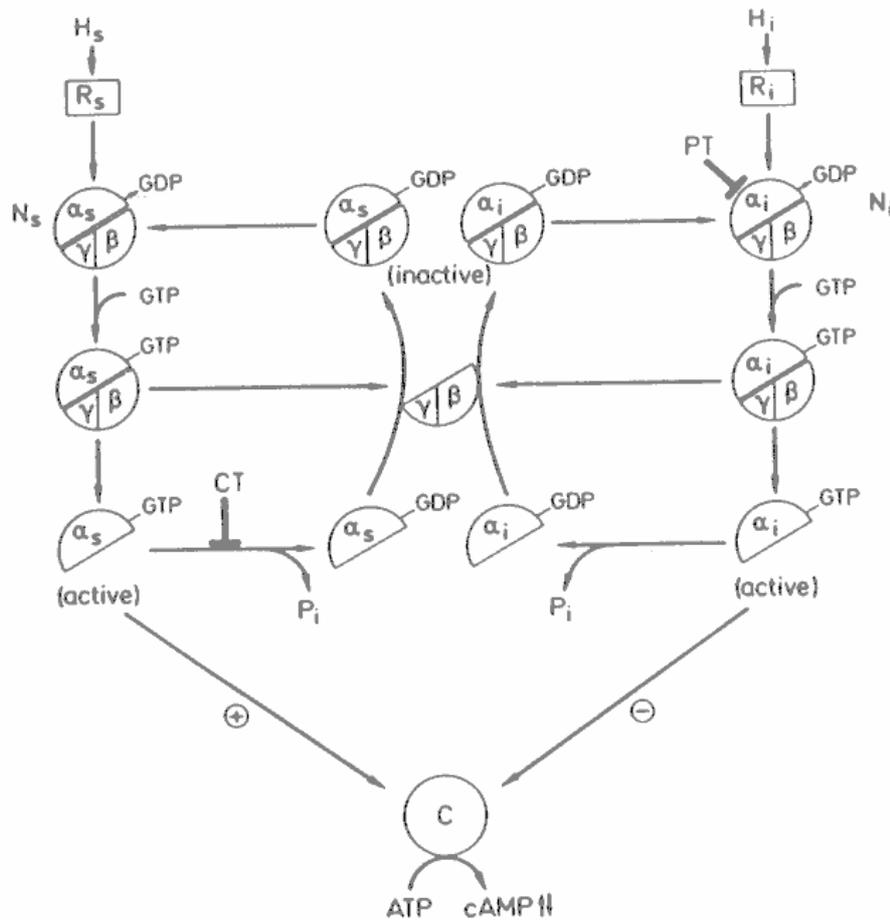


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo propuesto para la regulación de la actividad de la adenilato ciclasa (AC). C: subunidad catalítica de la AC. CT: toxina del cólera. H_i : ligandos inhibidores de la AC. H_s : ligandos estimuladores de la AC. G_i : proteína G inhibidora de la AC. G_s : proteína G estimuladora de la AC. PT: toxina pertusis. R_i : receptor inhibidor. R_s : receptor estimulador. α, β, γ : complejo α, β, γ de la proteína G respectiva. Tomado de: Handbook of Physiology III. The Gastrointestinal System. Signaling Transduction in Hormone- and Neurotransmitter-induced enzyme secretion from the exocrine pancreas. Schulz, I.

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

Recientemente se ha demostrado que los receptores ligados a la movilización del Ca^{2+} (los de la CCK y los receptores muscarínicos de la ACh) están funcionalmente acoplados a la PLC mediante distintas proteínas G (Schnefel y cols., 1988; Matozaki y cols., 1989).

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

2.5.1.2.- Efectores de membrana (fosfolipasa C y adenilato ciclasa).

La adenilato ciclasa, enzima que se encarga de la síntesis de AMPc, se encuentra en todos los tejidos animales. Se han descrito tres formas bioquímicamente diferentes: una sensible a calmodulina, inicialmente localizada en cerebro, una insensible presente en varios tejidos (ambas son proteínas de membrana), y una forma soluble encontrada únicamente en testículo. Ha sido posible clonar hasta seis tipos (Gao y Gilman, 1991; Tang y cols., 1991).

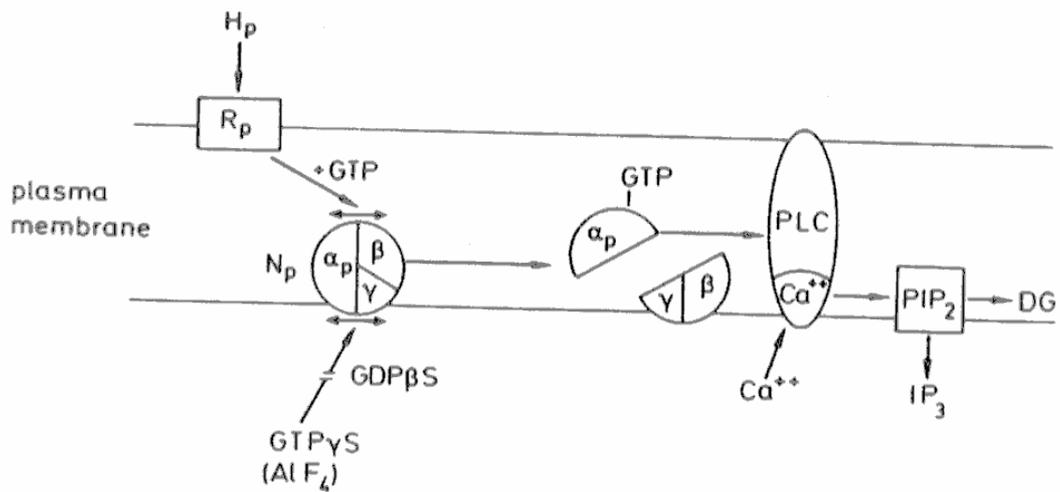


Figura 5. Representación esquemática del modelo propuesto para el acoplamiento de los receptores a la fosfolipasa C (PLC). Tomado de: Handbook of Physiology III. The Gastrointestinal System. Signaling Transduction in Hormone- and Neurotransmitter-induced enzyme secretion from the exocrine pancreas. Schulz, I.

En contraste con la AC, que como ya hemos dicho se localiza fundamentalmente en la membrana celular, la fosfolipasa C (PLC) se ha encontrado en el citoplasma de muchos tipos celulares (Yule y Williams, 1994). La PLC es, en realidad, una familia o conjunto de enzimas. Tras diversos estudios se han podido distinguir al menos nueve isoformas diferentes que se han clasificado en cuatro familias denominadas como α , β , δ y γ (Rhee y cols., 1989; Meldrum y cols., 1991). Unida a la diversidad de proteínas G existentes, esta multiplicidad de isoformas permite pensar que distintos agonistas pueden estimular diferentes proteínas G y/o diferentes formas de PLC para generar así patrones de respuesta específicos. Una representación esquemática para la activación de la PLC está representada en la figura 5.

Todos los tipos de PLC actúan tanto sobre el PIP₂, por el que presenta mayor afinidad, como sobre el fosfatidilinositol 4-fosfato (PI₄-P) y el fosfatidinositol (PI) (Dixon y Hokin, 1984; Catt y Batalla, 1989; Hokin y Dixon, 1990), y su función es hidrolizar el enlace éster entre el glicerol y el grupo fosfato del inositol existente en la estructura de estos fosfolípidos, generando diacilglicerol (DG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). Además de generar fosfatos de inositol y DG, hay una cierta proporción de fosfatos de inositol cíclicos que se forman como consecuencia de la propia forma de actuación de la enzima (Hokin y cols., 1987). Para su funcionamiento es preciso el ion Ca²⁺, que además puede estimular su actividad en rangos de concentración cercanos a los existentes en el citosol durante la estimulación (1 micromolar) (Taylor y cols., 1986). Además parece ser necesario que esta enzima, que se encuentra en el citosol, se una a la membrana antes de comenzar la hidrólisis de los fosfolípidos de inositol. Además del calcio, algunos autores han propuesto la participación de otros factores en su activación, como fosfatidilcolina, DG o ácidos grasos insaturados (Martin, 1989).

Estudios realizados en páncreas han revelado que en este tejido existen las formas β , γ y δ de PLC (Rhee y cols., 1991). Actualmente existen evidencias de que la PLC γ ₁ es activada por fosforilación de restos de tirosina tras la ocupación de los receptores de factores de crecimiento (Wahl y cols., 1989; Margolis y cols., 1989).

Otros efectores de membrana podrían estar implicados en la transducción de señales en el páncreas exocrino, pero no han sido caracterizados de manera precisa.

Estos podrían incluir PLC y fosfolipasa D (PLD) específicas de fosfatidilcolina, la fosfolipasa A₂, el intercambiador Na⁺/H⁺ y varios canales para iones; aunque estos pudieran estar regulados más por mensajeros intracelulares que directamente por proteínas G (Yule y Williams, 1994).

2.5.2.- Mensajeros intracelulares.

2.5.2.1.- Inositol 1,4,5-trifosfato.

La activación de la PLC conduce a la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP₂) para dar lugar a la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DG). Ambas moléculas actúan como mensajeros intracelulares iniciales.

El desarrollo de todo el conocimiento que actualmente se tiene sobre el metabolismo de los fosfatos de inositol ha sido fruto de numerosas investigaciones. Hokin y Hokin indicaron inicialmente el papel potencial que podría representar la participación de los fosfatos de inositol en la transducción de señales (Hokin y Hokin, 1954; 1955a; 1955b; 1956; 1959). La estimulación colinérgica de segmentos pancreáticos de paloma conducía al incremento en la incorporación de ³²P en las moléculas de los inositoles fosfato (Hokin y Hokin, 1953).

A pesar de que Michel postula la existencia de una relación entre los agonistas que aumentaban el metabolismo de los fosfolípidos de inositol y la movilización de calcio (Ca²⁺) (Michel, 1975), no fue hasta 1983 cuando se estableció el nexo de unión entre ambos. Berridge demostró que los agonistas estimulaban la hidrólisis de los fosfolípidos de inositol generando como producto inicial IP₃ (Berridge, 1983). Streb y cols. posteriormente encontraron que la adición de IP₃ a suspensiones de células acinares permeabilizadas de rata conducía a una rápida liberación de Ca²⁺ que parecía proceder de un depósito intracelular no mitocondrial (Streb y cols., 1983); establecieron así mismo que este fenómeno era específico de este isómero y que otros fosfatos de inositol no producían este fenómeno.

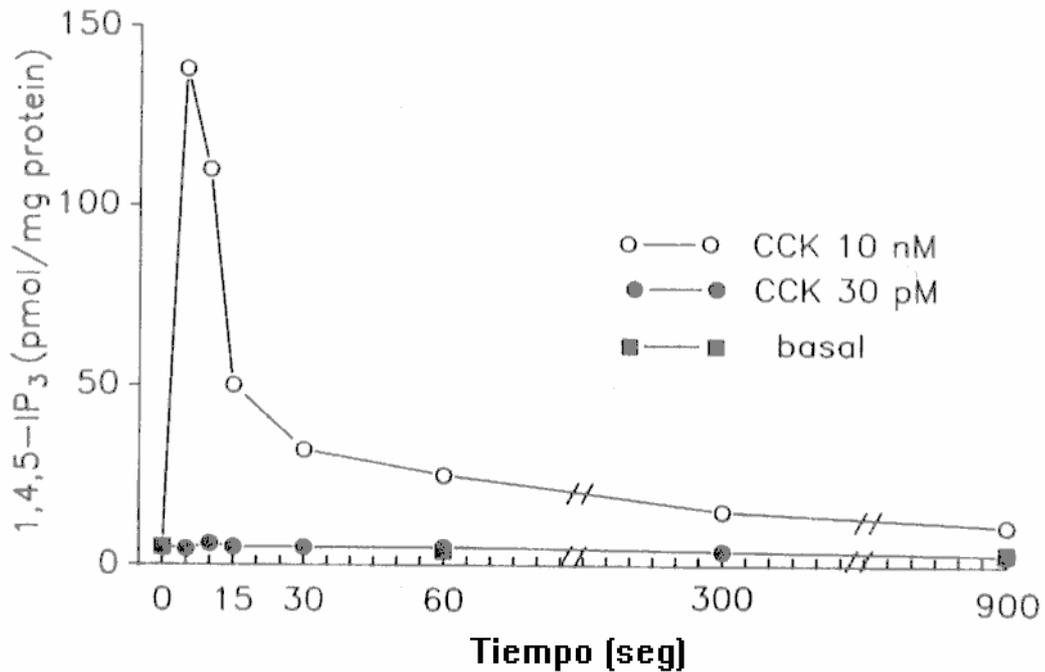


Figura 6. Gráfico que muestra la formación de IP_3 tras la estimulación de acinos pancreáticos con CCK. Tras la estimulación se alcanzó un máximo en la formación de IP_3 a los 5 segundos y posteriormente disminuyó su nivel hasta un valor menor pero aún por encima del basal, permaneciendo en ese nivel todo el tiempo que la CCK estaba actuando. La estimulación con concentraciones de CCK menores (30 pM) no produjo cambios detectables en la formación de IP_3 . Tomado de: *Physiology of The Gastrointestinal Tract; Stimulus-Secretion Coupling in the Pancreatic Acinus*. Yule D.I. y Williams, J.A. pp 1447-1472.

En acinos pancreáticos previamente incubados con [³H]-inositol, la estimulación con dosis máximas de carbacol o CCK conduce a un rápido aumento en los niveles de [³H]-IP₃. Esto se puede detectar entre los dos y cinco segundos siguientes a la estimulación, descendiendo a partir de los diez segundos a un nivel inferior pero permaneciendo elevado durante bastantes minutos (Rubin y cols., 1984). En la figura 6 se muestra un gráfico en que está representada la variación en la formación de IP₃ en acinos pancreáticos tras su estimulación con varias dosis de CCK. Diversos estudios han encontrado que tras la elevación de los niveles de IP₃ se pueden detectar varios isómeros de este fosfato de inositol, como el inositol 1,3,4-trifosfato o una forma cíclica del IP₃, el 1:2c 4,5-trifosfato (cIP₃) (Trimble y cols., 1987) que representa aproximadamente el 5% del IP₃ generado, pero se acumula en la célula debido a que es un sustrato menos hidrolizable, pudiendo ser importante en casos de estimulación en períodos más largos (Dixon y cols., 1987).

La estimulación con dosis máximas de CCK, bombesina y agentes colinérgicos incrementa los niveles de IP₃ alcanzando un valor máximo de 20 a 100 veces el basal (1-5 pmol/mg prot.), detectado al cabo de cinco segundos de la estimulación, para luego retornar a valores inferiores pero aún por encima del basal (Matozaki y cols., 1989; 1990; 1991; Rowley y cols., 1990). Sin embargo, a dosis más bajas, la estimulación con los mismos agentes secretagogos no reveló la existencia de cambios en el metabolismo de los fosfatos de inositol, si bien esta dosis producían efectos sobre la movilización de Ca²⁺ y la secreción de enzimas. No está claro aún si se trata realmente de una ausencia de metabolismo de los mismos ó si es el resultado de la baja sensibilidad de los procedimientos utilizados.

El IP₃ desaparece tras su formación y es metabolizado por dos rutas; una cinasa (3-cinasa) que es sensible al complejo Ca²⁺/calmodulina, lo fosforila para formar IP₄ (Irvine y cols., 1986) y posteriormente es defosforilado por una 5-fosfomonoesterasa a inositol 1,3,4-trifosfato. Esta molécula puede ser nuevamente fosforilada para formar otros inositoles más fosforilados (1,3,4,6-tetrakisfosfato, IP₅ o IP₆) o defosforilado a inositol 1-fosfato (PI-1) o inositol 3-fosfato (PI-3) (Berridge e Irvine, 1989).

Por la otra ruta el IP₃ puede ser defosforilado secuencialmente para formar inositol 1,4-bifosfato (1,4-IP₂) e inositol 4-fosfato (4-IP), para los cuales no se ha

encontrado papel fisiológico hasta la fecha. Los niveles del derivado fosforilado del IP₃, el inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato (IP₄), aumentan tras la estimulación de las células pero, a diferencia de lo que ocurre con el IP₃, este incremento se mantiene en presencia del agonista (Trimble y cols., 1987). Se ha propuesto un papel para el IP₄ basándose en la necesidad del gasto de energía por la célula para sintetizarlo (Theibert y cols., 1991). En algunas células se le ha relacionado con la entrada de Ca²⁺ al citosol procedente del medio extracelular, o bien se piensa que facilita la comunicación entre los depósitos intracelulares de Ca²⁺ (Irvine y Moor, 1986; Morris y cols., 1987; Hill y cols., 1988); incluso se le ha relacionado con la liberación de Ca²⁺ desde los depósitos (Parker e Ivorra, 1991) o, al menos, es un agente facilitador de este proceso. Sin embargo no hay evidencias claras sobre su papel en las células acinares pancreáticas.

La gran complejidad de las rutas metabólicas hace pensar que alguno de los compuestos tiene funciones de señalización intracelular aún desconocidas; por ejemplo, se han propuesto acciones del 1,4-IP₂ y del 4-IP sobre una DNA polimerasa porque las enzimas que los generan están en el núcleo de la célula. Para el caso del 3-IP se ha propuesto una acción moduladora sobre el citoesqueleto. Es posible incluso que esta complejidad sea fruto de la necesidad de metabolización de los compuestos conocidos como IP₃ e IP₄ (Berridge e Irvine, 1989).

2.5.2.2.- Calcio intracelular [Ca²⁺].

Hoy día está claramente demostrada la importancia que tiene el ion Ca²⁺ en las respuestas del páncreas exocrino al grupo de secretagogos que activan la vía de los fosfolípidos de inositol. La primera referencia acerca del páncreas exocrino aparece en 1966 (Hokin, 1966), y en la década de los 70 diversos autores demuestran la intervención del ión Ca²⁺ en los procesos de exocitosis en el páncreas exocrino (Argent y cols., 1976).

En el páncreas exocrino y otros tejidos (de manera diferente a como sucede en las células cromafines o las β pancreáticas) la secreción inicial que tiene lugar tras la estimulación no depende de la presencia de Ca²⁺ en el medio externo, mientras que la secreción tardía o sostenida (a partir de los cinco minutos tras la aplicación del estímulo) sí necesita de la presencia de Ca²⁺ en el medio extracelular (Petersen e

Iwatsuki, 1979; Krims y Pandol, 1988; Sung y Williams, 1988). De esta manera se ha sugerido la existencia de dos fases en las respuestas mediadas por Ca^{2+} :

- una primera fase, en la que se produce la liberación del Ca^{2+} almacenado en los depósitos intracelulares,
- y una segunda fase, tardía o sostenida, en la que se produce la entrada de Ca^{2+} procedente del medio extracelular.

El desarrollo de indicadores fluorescentes sensibles al Ca^{2+} ha facilitado enormemente la monitorización de los cambios que se producen en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La información que actualmente se tiene sobre el patrón de movilización del Ca^{2+} en los diversos tipos celulares es muy elevada, y ha sido objeto de numerosas revisiones. Las primeras evidencias que se tienen sobre la movilización de Ca^{2+} en respuesta a la estimulación con secretagogos que actúan por la vía de los fosfolípidos de inositol fueron obtenidas utilizando determinaciones de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, electrodos y fosfoproteínas sensibles al Ca^{2+} (Williams, 1980; Schulz y Stolze, 1980; Hootman y Williams, 1987).

Determinaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ empleando el indicador fluorescente Quin-2, y más recientemente fura-2, indo-1 y fluo-3, han permitido conseguir mucha más información acerca de los aspectos espaciales y temporales de los mecanismos reguladores de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células acinares pancreáticas. Estos experimentos se realizaron inicialmente sobre suspensiones de células acinares y, más recientemente, sobre células aisladas (“single cell”) mediante técnicas de microespectrofluorimetría, análisis digital de imágenes o por detección de corrientes iónicas activadas por Ca^{2+} (“patch clamp”). De estos estudios se desprende que tras la estimulación con dosis máximas de CCK, bombesina o agonistas colinérgicos, se produce un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de entre 4 y 10 veces el valor de reposo, alcanzando un máximo que en ocasiones está en torno a $1\ \mu\text{M}$, valor que se alcanza rápidamente, en cuestión de segundos (Yule y Gallacher, 1988; Stuenkel y cols., 1989). A continuación se produce una reducción en el curso de los 2-5 minutos siguientes hasta un nivel estable por encima del valor basal (Muallem y cols., 1988; 1990; Hurley y Brinck, 1990; Sjödin y cols., 1990). También el estímulo selectivo de las proteínas G (empleando fluoruro de sodio -NaF-, compuesto que se sabe estimula las proteínas G de membrana sin necesidad de actuar sobre los receptores celulares) ha

demostrado tener el mismo patrón sobre el nivel de Ca^{2+} citosólico (Matozaki y cols., 1988).

Estudios en los que las células eran estimuladas en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular muestran que el incremento inicial en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es independiente de la presencia de este ion en el exterior; sin embargo, la fase posterior de respuesta sostenida (meseta) no se observa. De igual manera, cuando en la respuesta sostenida eliminamos el Ca^{2+} del medio la respuesta se ve atenuada, descendiendo el nivel de Ca^{2+} citosólico, indicando una absoluta dependencia del Ca^{2+} extracelular (Pandolf y cols., 1987; Stuenkel y cols., 1989; Muallem y cols., 1989; Tsunoda y cols., 1990). La elevación inicial que se produce en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se piensa que es debida a la producción de IP_3 , ya que la variación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el tiempo y la dependencia en la dosis de agonista aplicado es similar a la que sigue la formación de IP_3 .

En células acinares pancreáticas en reposo, como ocurre en otras células, la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) varía entre 50 y 200 nM. Para mantener estos valores tan bajos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, si se comparan con la que existe en el medio extracelular, es necesario por parte de la célula contrarrestar la gran tendencia que hay a la entrada de este ion en el citoplasma debido al gradiente de concentración y al potencial intracelular negativo. Para ello existen varios mecanismos de transporte en la membrana celular y en los orgánulos citoplasmáticos, que mantienen la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dentro de los valores normales (Muallem, 1989). Un mecanismo importante para mantener los valores de reposo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es el que está representado por la bomba adenosina trifosfatasa dependiente del ion Mg^{2+} (Ca^{2+} -ATPasa) (Ansah y cols., 1984; Bayerdorffer y cols., 1985) que transporta Ca^{2+} al medio externo. Esta bomba desempeña igualmente un importante papel cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tiene que retornar a los valores basales tras la estimulación de las células. Recientemente se ha demostrado que la salida de Ca^{2+} desde el citoplasma se puede detectar segundos después de su incremento en el citosol. Este aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ parece seguir muy de cerca al incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, incluso cuando se están produciendo oscilaciones (Tepikin y cols., 1992).

2.5.2.2.1.- Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares.

De los experimentos iniciales en los que se ensayaba el efecto de los secretagogos sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se llegó a la conclusión de que este ion era liberado desde un depósito intracelular, que podría ser el retículo endoplásmico (RE), sin que se produjeran cambios significativos en otros compartimentos celulares como la mitocondria o los gránulos de secreción (Dormer y Williams, 1981). La propuesta de que el IP_3 es el mensajero encargado de iniciar la señal de Ca^{2+} se vio confirmada por el modo en que esta molécula era generada en las células. Los secretagogos producen una adecuada correlación entre la formación de IP_3 y la liberación de Ca^{2+} (Streb y cols., 1985; Powers y cols., 1985; Dixon y Hokin, 1987; Rowley y cols., 1990), y se sabe que el depósito desde el que se libera este ion es el RE porque estudios bioquímicos y estructurales han revelado que este fenómeno es reproducible en vesículas de RE y no en vesículas procedentes de la membrana celular (Streb y cols., 1984; Dormer y Williams, 1981; Walz y Baumann, 1989).

Sin embargo, la identidad y localización precisa de este depósito aun no se ha determinado con exactitud en células no musculares (donde se sabe con seguridad que se trata del retículo sarcoplásmico -RS-) (Tsien y Tsien, 1990). Hay resultados que sugieren que se trata de una zona del RE (Streb y cols., 1983; 1984; Thevenod y cols., 1989; Han y Nuccitelli, 1990), pero también se ha descrito un orgánulo, denominado calciosoma, similar al RE pero físicamente separado, que contiene la proteína captadora de Ca^{2+} , calsecuestrina, y al que los autores atribuyen la función de depósito en ciertos tejidos (incluido el páncreas exocrino) (Volpe y cols., 1986). Otros resultados también coinciden con esa primera descripción de un depósito diferente al RE (Rossier y cols., 1991). Actualmente la identidad morfológica del depósito de Ca^{2+} , así como su localización precisa dentro de la célula, están poco claras y es difícil de establecer, aunque sí se puede explicar el patrón de movilización del Ca^{2+} acumulado en su interior (Tsien y Tsien, 1990).

Se ha propuesto que el IP_3 induce la liberación de Ca^{2+} a través de un complejo formado por su receptor y un canal iónico (Joseph y Williamson, 1986), purificado por primera vez en células de Purkinje (Supattapone y cols., 1988). No hay consenso acerca de si está situado en la parte externa de la membrana o en su interior (Tsien y Tsien,

1990). La unión con el receptor precisa de los grupos fosfato en las posiciones 4 y 5 del anillo de inositol, y presenta un alto grado de cooperatividad, siendo necesaria la unión de tres moléculas de IP₃ para que se libere el Ca²⁺ (Nahorski y Potter, 1989).

Los datos estructurales existentes indican que el receptor es un tetrámero (Supattapone y cols., 1988) que presenta homología con el receptor de rianodina (localizado en el RS de las células musculares esqueléticas, en las que se cree que acopla la despolarización y la entrada de Ca²⁺ en los túbulos T con la liberación de Ca²⁺ desde el RS) (Chandler y cols., 1976). Presenta cuatro regiones transmembranas, con los extremos C-terminal y N-terminal localizados en o cerca del lumen del retículo y el citosol respectivamente (Furuichi y cols., 1989). Cuando ha sido purificada, esta proteína ha demostrado poseer un lugar para el reconocimiento del IP₃ y un canal asociado para la liberación del Ca²⁺ (Ferris y cols., 1989).

El mecanismo por el que el receptor produce la liberación del Ca²⁺ del depósito es la apertura de un canal de 10 pS de conductancia (Berridge e Irvine, 1989). En este proceso hay un fenómeno de amplificación, pues los datos estequiométricos demuestran que por cada molécula de inositol se liberan 20 iones Ca²⁺ (Berridge e Irvine, 1984). Al parecer la liberación tiene lugar de modo cuantal (Berridge e Irvine, 1989; Muallem y cols., 1989), hecho que concuerda con la demostración, por Muallem y cols. (1989), de que el Ca²⁺ intracelular movilizado en las células acinares del páncreas por los secretagogos tiene respuestas de tipo “todo-nada”.

Se han descrito posibles lugares de regulación del receptor del IP₃. El receptor es fosforilado por la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa II (PKII) (dependiente del complejo Ca²⁺-calmodulina) (Ferris y cols., 1991) representando esto un posible mecanismo retroalimentación en la transducción de la señal. Estudios realizados en páncreas exocrino han demostrado resultados que apoyan este hecho: el tratamiento con activadores de la PKC no afectan a la hidrólisis del PIP₂ pero sí inhiben la secreción y la liberación de Ca²⁺ por las células (Willems y cols., 1982; 1989). Además esta proteína es fosforilada por una proteína cinasa A (PKA) reduciendo la potencia del receptor del IP₃ para liberar Ca²⁺ (Supattapone y cols., 1988). En este receptor también se han encontrado puntos de unión para adenina y Ca²⁺.

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

La terminación del efecto del IP_3 no se produce por desensibilización del receptor (Nicotera y cols., 1990; Boyton y cols., 1990), lo que indica que debe ser por medio de metabolización (Berridge e Irvine, 1989), aunque estudios realizados recientemente sugieren que el mismo IP_3 inactiva el receptor.

En estudios recientes se ha encontrado que el IP_3 es capaz de liberar solamente una porción del Ca^{2+} movilizable, indicando que el IP_3 podría no ser el único mediador en la liberación de Ca^{2+} intracelular (Thevenod y cols., 1989; Biden y cols., 1986). Además se ha propuesto la existencia de distintos puntos de almacenamiento para este ion basándose en las propiedades de los mismos para la captura de Ca^{2+} (Thevenod y cols., 1989), esto es, un depósito sensible a IP_3 y otro insensible. En otros sistemas el GTP es un compuesto que se ha incluido como mediador en la comunicación entre los depósitos (Gill y cols., 1989); incluso en el páncreas se ha propuesto que la ribosa-cADP sería el mensajero para el depósito insensible a IP_3 (Thorn y cols., 1994).

Actualmente no está claro si ambos depósitos, sensible e insensible a IP_3 , están localizados en el mismo orgánulo. Estudios farmacológicos e inmunológicos han indicado que estos dos depósitos son, al menos parcialmente, diferentes (Tsunoda, 1993), contribuyendo ambos a los procesos de señalización del Ca^{2+} (Biden y cols., 1986).

2.5.2.2.2.- Salida del Ca^{2+} desde el citoplasma.

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

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

Un estudio simultáneo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y del transporte de Ca^{2+} al medio extracelular en células aisladas mediante la denominada técnica de la “droplet” ha demostrado que la bomba de Ca^{2+} se activa y desactiva de manera muy rápida siguiendo estrechamente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Tepikin y cols., 1994), incluso “oscilando” con las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

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

2.5.2.2.3.- Oscilaciones de Ca^{2+} .

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

La gran liberación de Ca^{2+} producida en respuesta a la estimulación con dosis altas de secretagogos se produce durante los primeros 2-5 segundos (Muallem y cols., 1989). Sin embargo, para concentraciones inferiores existe un período de retraso en la aparición de la respuesta de Ca^{2+} que depende de la dosis de agonista empleada y que aumenta cuando ésta disminuye (0,5-3 minutos hasta la aparición de la primera espiga).

Así, las células producen liberaciones de Ca^{2+} repetitivas, sin que exista movilización masiva de todo el Ca^{2+} acumulado. Este fenómeno se ha descrito en células pancreáticas aisladas de ratón y cobaya (Yule y Gallacher, 1988; Osipchuk y cols., 1990; Sjödin y cols., 1991) o rata (Stuenkel y cols., 1989; Tsunoda y cols., 1990), así como en otros muchos tejidos. En la figura 7 están representados registros típicos de oscilaciones producidas en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la estimulación de las células acinares pancreáticas con diferentes dosis de agonistas.

Las oscilaciones pueden iniciarse en ausencia de Ca^{2+} extracelular y muestran tener dependencia de ATP, como así ha sido revelado en estudios en los que la deplección de los niveles de ATP inhibían el patrón oscilatorio (Tsunoda y cols., 1990), de manera que podría existir un mecanismo de recaptación de Ca^{2+} dependiente de ATP. Sin embargo, el Ca^{2+} extracelular es necesario para mantener las oscilaciones, especialmente en el caso de la ACh, posiblemente debido al vaciamiento de los depósitos (Yule y Gallacher, 1988; Tsunoda y cols., 1990).

Tras la estimulación con dosis bajas de agonista, las oscilaciones de Ca^{2+} se producen con una frecuencia de entre 1 y 4 ciclos por minuto durante todo el tiempo que el agonista está presente. La forma que presentan estas oscilaciones varía de unos tipos celulares a otros pudiendo tener una apariencia sinusoidal, picos o espigas transitorias que retornan siempre al basal, oscilaciones asimétricas o bien oscilaciones sobre un nivel de Ca^{2+} elevado con respecto al basal. En el páncreas exocrino la CCK induce oscilaciones transitorias o irregulares (con valles que llegan al basal) mientras que la ACh genera oscilaciones sobre una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevada (Toescu y Petersen, 1995).

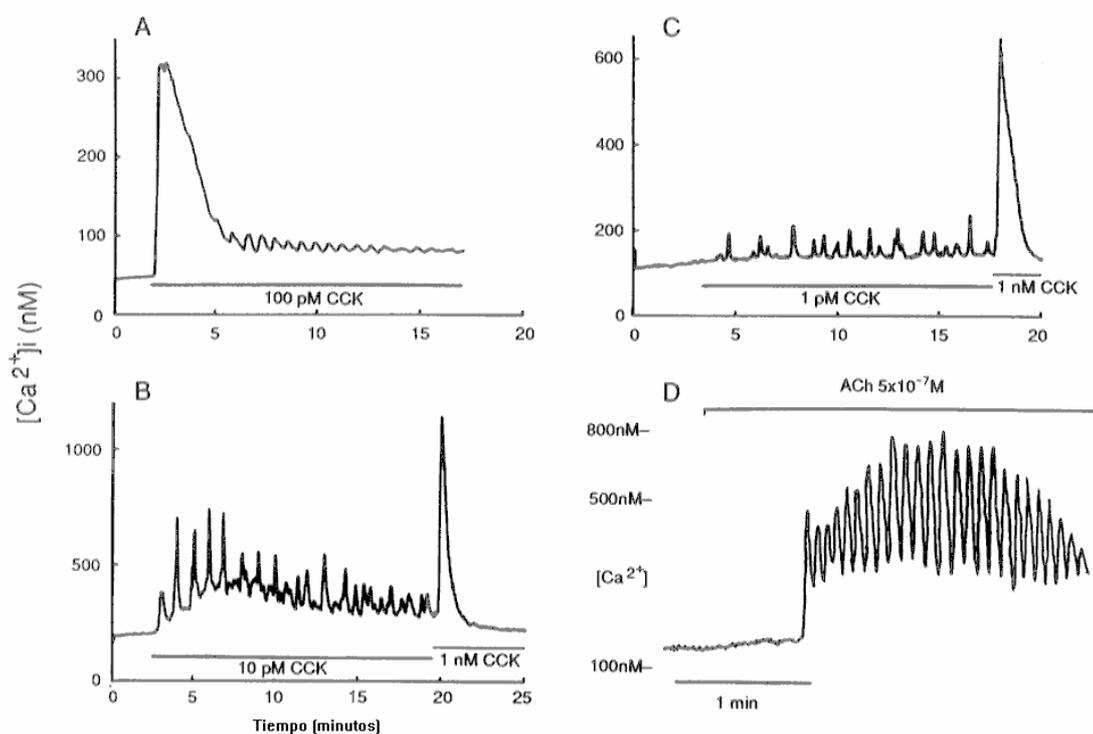


Figura 7. Diagramas que muestran oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la estimulación de células acinares pancreáticas de rata con bajas concentraciones de CCK (A, B y C). En D está representada la respuesta típica originada por la estimulación de estas mismas células con ACh (50 nM) en ratón. Tomado de: *Physiology of The Gastrointestinal Tract; Stimulus-Secretion Coupling in the Pancreatic Acinus*. Yule D.I. y Williams, J.A. pp 1447-1472.

Hay muchos modelos que han intentado explicar el mecanismo de generación de las oscilaciones, modelos que tenían en cuenta los mecanismos de liberación del Ca^{2+} intracelular y la entrada del mismo desde el exterior. Aunque no hay consenso acerca de cómo se producen, todos los modelos actuales implican a las proteínas G y a la formación de IP_3 para la producción del pico inicial en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

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

En las *oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ controladas por receptor* se producen cambios en la concentración de IP_3 . Debería existir una retroinhibición sobre la actuación de la PLC, que podría estar mediada por la PKC que fosforilaría la proteína G de membrana, cesando así la producción de IP_3 (Tsien y Tsien, 1990; Tsunoda y cols., 1990). Una nueva oscilación se produciría cuando la actividad de la PKC se reduce por sí misma, momento durante el cual el agonista sigue actuando sobre su receptor y escapa a esta inhibición (Berridge y cols., 1988).

En otro modelo, el Ca^{2+} liberado por el IP_3 activa la hidrólisis del PIP_2 para amplificar la producción del IP_3 tras su metabolización. Más Ca^{2+} es liberado tras la nueva generación de IP_3 . Cuando éste ha sido metabolizado el Ca^{2+} es transportado hacia los depósitos, preparándose así un nuevo ciclo que se iniciaría con la liberación de Ca^{2+} por el IP_3 residual. El Ca^{2+} liberado activaría a la PLC con lo que el ciclo volvería a repetirse (Meyer y Stryer, 1988).

Hay un tercer modelo en el que el Ca^{2+} liberado interfiere con el receptor de IP_3 (se produce un “feedback” negativo por parte del Ca^{2+}). La producción de IP_3 desencadena una liberación inicial de Ca^{2+} desde los depósitos y, a medida que se incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se está produciendo una inhibición de la liberación inducida por el IP_3 . Conforme el Ca^{2+} es transportado fuera del citosol esta inhibición va desapareciendo, de manera que ello conduce a la nueva unión del IP_3 a su receptor comenzando nuevamente el ciclo (Suppatapone y cols., 1988). Sin embargo, en células acinares pancreáticas permeabilizadas la inhibición de la liberación de Ca^{2+} estimulada

por IP₃ debida al incremento en la [Ca²⁺]_i solamente se ha observado cuando la [Ca²⁺]_i alcanza valores próximos a 10 μM, mientras que la [Ca²⁺]_i oscila normalmente en valores entre 300 y 500 nM (Tsunoda, 1993).

Sin embargo, todos estos modelos tienen en contra que no se ha podido demostrar hasta el momento que se produzcan oscilaciones en la concentración de IP₃ (Berridge e Irvine, 1989). Además, no explican como niveles constantes de este mensajero pueden producir oscilaciones de [Ca²⁺]_i, hecho corroborado por infusiones intracelulares de su análogo no metabolizable IPS₃ (Wakui y cols., 1989), al igual que ocurre al aumentar experimentalmente la [Ca²⁺]_i (Berridge, 1990; Petersen, 1992). Incluso hay agonistas que pueden inducir oscilaciones en la [Ca²⁺]_i sin producir cambios detectables en el nivel de IP₃, fenómeno que se observa tras el tratamiento de las células con JMV-180, agonista de los receptores de alta afinidad de la CCK, el cual induce oscilaciones en la [Ca²⁺]_i (Matozaki y cols., 1990). Más aun, el inhibidor de la PLC, U73122, no inhibe las oscilaciones inducidas por JMV-180 (Yule y Williams, 1992). Consecuentemente existen otros mecanismos implicados en la generación de las oscilaciones de Ca²⁺ intracelular; por ejemplo, el ácido araquidónico (Owiang y cols., 1988) y las esfingosinas producen oscilaciones (Yule y cols., 1993) al igual que otros candidatos a mensajeros intracelulares, como la ribosa-cADP (Thorn y cols., 1994) produce oscilaciones.

En las *oscilaciones controladas por segundos mensajeros* el argumento clave es el fenómeno de la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (“*calcium induced calcium release*”, CICR) (Berridge, 1988). El IP₃ es capaz de liberar una pequeña cantidad del Ca²⁺ de los depósitos, existiendo un depósito sensible y otro insensible a IP₃, y se ha sugerido que el Ca²⁺ liberado desde el primero desencadena la liberación desde el segundo (Goldbetter y cols., 1990; Petersen y Wakui, 1990), produciéndose lapsos entre cada liberación por el tiempo necesario para su recarga. Evidencias que apoyan este modelo se han obtenido de experimentos en los que incrementando artificialmente la [Ca²⁺]_i con inyecciones de Ca²⁺ o mediante el tratamiento con ionóforos, se originan oscilaciones (Osipchuk y cols., 1990; Wakui y Petersen, 1990; Wakui y cols., 1990). También se ha observado que la cafeína, un agente que libera Ca²⁺ con independencia

de la formación de IP₃, puede afectar a las oscilaciones e incluso, en ocasiones, inducir las por sí misma (Osipchuk y cols., 1990).

Es necesario tener en cuenta el proceso de entrada de Ca²⁺ procedente del medio extracelular a la hora de explicar los ciclos, ya que es necesario para la recarga de los depósitos intracelulares. De todas formas, la complejidad de las oscilaciones que se producen en los diferentes tipos celulares que se han estudiado hasta el momento induce a pensar que en una misma célula se desarrollen distintos mecanismos compatibles entre sí.

Aún más especulación se ha dirigido hacia la significación funcional que pueden representar las oscilaciones descubiertas en la [Ca²⁺]_i ante la estimulación con secretagogos. En otros tejidos se las ha relacionado con procesos tan dispares como secreción, aprendizaje y memoria (Berridge y Galione, 1988). Pero en el caso del páncreas exocrino, así como en otros muchos tejidos donde también se han descrito oscilaciones, el significado de este fenómeno aun no se conoce con certeza, aunque se le ha relacionado con el control de la secreción fluida y de enzimas. Probablemente, una señal oscilante sea más fácil de controlar y modular que una sostenida, evitándose además los posibles efectos tóxicos que presentaría un aumento continuado en la [Ca²⁺]_i.

2.5.2.2.4.- Aspectos espaciales de la señal de Ca²⁺.

Recientemente la determinación de la [Ca²⁺]_i mediante el empleo de técnicas de análisis de imagen y microscopía confocal de láser ha proporcionado interesantes datos sobre la propagación de la señal de Ca²⁺ a lo largo de la célula acinar (Toescu y cols., 1992; Nathanson y cols., 1992). Estos resultados han revelado que la señal de Ca²⁺ se inicia en el polo luminal de la célula y posteriormente se extiende a modo de ola hacia el polo basal (Toescu y cols., 1992; Nathanson y cols., 1992). La importancia de este fenómeno se desconoce por el momento, pero parece reflejar la localización del punto inicial de liberación de Ca²⁺, debido a la mayor concentración de receptores de IP₃ o una mayor sensibilidad al IP₃.

El modelo de la CICR puede explicar las ondas de propagación espacial del Ca^{2+} . Si los depósitos tienen la adecuada disposición a lo largo de la célula, este mecanismo podría ser el responsable de la aparición de estas ondas. Esto ha sido propuesto para el caso del páncreas exocrino (Kasai y Augustine, 1990; Petersen, 1992) y para otros modelos como hepatocitos (Berridge, 1990) o en oocitos, donde estas ondas presentan la forma de espirales (Lechleiter y Clapham, 1992). Incluso se ha descrito la existencia de espigas locales de Ca^{2+} que solamente si presentan suficiente amplitud se propagarían a lo largo del citosol (Petersen, 1992). Esta liberación local de Ca^{2+} en el polo luminal, donde se acumulan los gránulos de zimógeno, produciría o facilitaría su exocitosis (Petersen y cols., 1993).

Schulz y cols. (1989) relacionaron el modelo de los dos depósitos con el sistema de captación de Ca^{2+} en su interior: un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hace que se incremente su acumulación en el depósito sensible a IP_3 , con lo cual salen protones (H^+) que se intercambian por Ca^{2+} estimulando su transporte activo hacia el interior del depósito. Esto llevaría a la reducción del pH local alrededor del depósito, que afectaría a un segundo, el insensible a IP_3 , liberando su Ca^{2+} . El IP_4 cooperaría en la entrada de Ca^{2+} en el interior del primer depósito desde el segundo y/o desde el medio extracelular, al igual que lo haría el GTP.

No está claro cual puede ser el significado fisiológico de este fenómeno pero parece ser, en todo caso, un modo de coordinar y extender ordenadamente la información a los distintos puntos del interior celular.

2.5.2.2.5.- Entrada de Ca^{2+} extracelular.

Con anterioridad nos hemos referido a que para el mantenimiento de la respuesta sostenida de Ca^{2+} en las células acinares pancreáticas es necesaria la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular. Así, debe existir un incremento en la permeabilidad de la membrana celular al Ca^{2+} extracelular, proceso que está favorecido por el gradiente de concentración existente a través de la membrana plasmática, y que está en estrecha relación con el mecanismo de recarga de los depósitos intracelulares. El mecanismo que subyace a la entrada de Ca^{2+} en las células acinares pancreáticas es poco conocido. La entrada de Ca^{2+} se produce a través de canales independientes de voltaje, ya que no es

sensible al potencial de membrana o a bloqueantes orgánicos de los canales de Ca^{2+} , como la nifedipina o el verapamil. Esta entrada es bloqueada por los iones La^{3+} , Ni^{2+} y Co^{2+} (Pandol y cols., 1987; Tsunoda, 1990), lo que parece indicar que la entrada de Ca^{2+} en las células acinares pancreáticas se produce a través de canales no específicos para el Ca^{2+} , a diferencia de otras células en que existen varios tipos de canales para este ion (Tsien y Tsien, 1990). También existe sensibilidad al pH extracelular (pH_o): la entrada de Ca^{2+} se ve favorecida en medio alcalino mientras que se reduce en los medios ácidos (Muallem y cols., 1989; Tsunoda y cols., 1990).

Existe alguna hipótesis que intenta explicar este proceso, entre ellas la posibilidad de que haya algún canal no específico de este catión activado por IP_3 en la membrana de la célula (Kuno y Gardner, 1987); también el IP_3 y el IP_4 podrían actuar paralelamente para permitir la entrada de Ca^{2+} y la recarga de los depósitos intracelulares a través de un canal localizado en la membrana plasmática (Berridge e Irvine, 1989; Irvine, 1992).

Otro mensajero intracelular, la guanina monofosfato cíclica (GMPC), formada en respuesta a un aumento de óxido nítrico (NO) producido por los secretagogos que movilizan Ca^{2+} (Pandol y cols., 1994), podría estar implicado en este proceso. Finalmente, alguno de los acontecimientos que suceden a la activación de la PLC y PKC han sido implicados en el control de la entrada de Ca^{2+} , así como el ácido araquidónico (AA) y el citocromo P-450 (para una revisión ver Tsunoda, 1993). Otros han identificado un pequeño compuesto de peso molecular inferior a 500, aniónico y fosforilado que activa la entrada de Ca^{2+} (Randriamampita y Tsien, 1993), que han denominado “factor para el influx de Ca^{2+} ” (CIF) y que se piensa es generado en aquellas células cuyos depósitos de Ca^{2+} se han vaciado tras la respuesta a algún estímulo. Aún así, no hay consenso sobre el mecanismo que realmente está actuando en este proceso. Sin embargo, en muchos tipos de células, parece firmemente establecido que la entrada de Ca^{2+} parece estar regulada por el grado de vaciamiento de los depósitos, denominado *modelo capacitativo para la entrada de Ca^{2+}* (Putney, 1986; 1990); esto es, cuando los agonistas liberan el Ca^{2+} de los depósitos, mediante algún mecanismo aún desconocido este vaciamiento abre el canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática.

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

2.5.2.2.6.- Recarga de los depósitos de Ca^{2+} .

En el modelo que nos ocupa y en otros tejidos, como la glándula parótida, se ha caracterizado el mecanismo por el que el depósito acumula Ca^{2+} . Bajo estimulación intensa los depósitos permanecen vacíos durante el tiempo que el estímulo está actuando, de manera que su recarga es necesaria para una posterior respuesta de Ca^{2+} . Este proceso requiere la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular y la retirada del estímulo. El tiempo requerido para este proceso varía de unos tipos de células a otros estando entre 7 y 15 minutos en el caso de las células acinares pancreáticas (Stuenkel y cols., 1989). En la mayoría de los casos, la recarga de los depósitos se produce con un nivel constante de Ca^{2+} citosólico próximo o igual al de reposo (Pandol y cols., 1987; Stuenkel y cols., 1989; Tsunoda, 1993). Cuando las células se someten a concentraciones de secretagogos, como la CCK, consideradas fisiológicas, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ muestra oscilaciones, y en ellas también interviene la recaptación de Ca^{2+} por los depósitos intracelulares (Petersen y cols., 1993).

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

Los estudios realizados mediante el empleo de inhibidores de las bombas celulares de Ca^{2+} y de protones indican que el depósito de Ca^{2+} sensible a IP_3 tiene una bomba de H^+ que crea un gradiente ácido en su interior, que es la fuerza motriz para captar el Ca^{2+} por medio de un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. Al parecer, este intercambio también puede realizarse por medio de un proceso dependiente de Mg^{2+} y ATP. El

depósito no sensible a IP_3 acumula el Ca^{2+} a través de una bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP, captando Ca^{2+} cuando su concentración es cercana a la de reposo (Schulz y cols., 1989).

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

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

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

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

2.5.2.2.7.- Mecanismos efectores del Ca^{2+} : Ca^{2+} -calmodulina.

Aunque es posible para el Ca^{2+} unirse directamente a proteínas (enzimas), la mayoría de las acciones del ion Ca^{2+} se ejercen a través de la calmodulina (CAM), molécula ubicua cuya presencia en el páncreas exocrino fue descrita por Vandermeer y cols. (1977) y que es capaz de unir cuatro iones Ca^{2+} (al menos tres para ser activa); una vez que es activada participa en la regulación de otras proteínas (proteínas cinasas, fosfatasas y fosfodiesterasas) (Hootman y Williams, 1987).

Se cree que en el citosol de las células acinares pancreáticas existen dos proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} (Sung y Williams, 1988), además de haberse identificado una cinasa en los gránulos de zimógeno (Burham y cols., 1985). Nairn y cols. (1985) demostraron la existencia de una cinasa diferente denominada cinasa III. Otros mecanismos por los que podría actuar el Ca^{2+} podrían ser la inhibición de la PLA_2 o la estimulación de la cinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK).

Finalmente, en el páncreas exocrino se han estudiado una serie de canales iónicos activados por Ca^{2+} que permiten a estas células formar una secreción fluida para vehicular las enzimas digestivas hasta los conductos pancreáticos (Petersen, 1992). Estos estudios son la base del modelo actualmente aceptado de secreción de iones y agua por las glándulas exocrinas.

2.5.2.3.- 1,2-diacilglicerol y proteína cinasa C.

También se ha establecido un papel como segundo mensajero para el 1,2-diacilglicerol (DG), activador endógeno de la proteína cinasa C (PKC) (Nishizuka, 1984; 1992). Es el otro producto generado por la PLC tras la hidrólisis del PIP_2 .

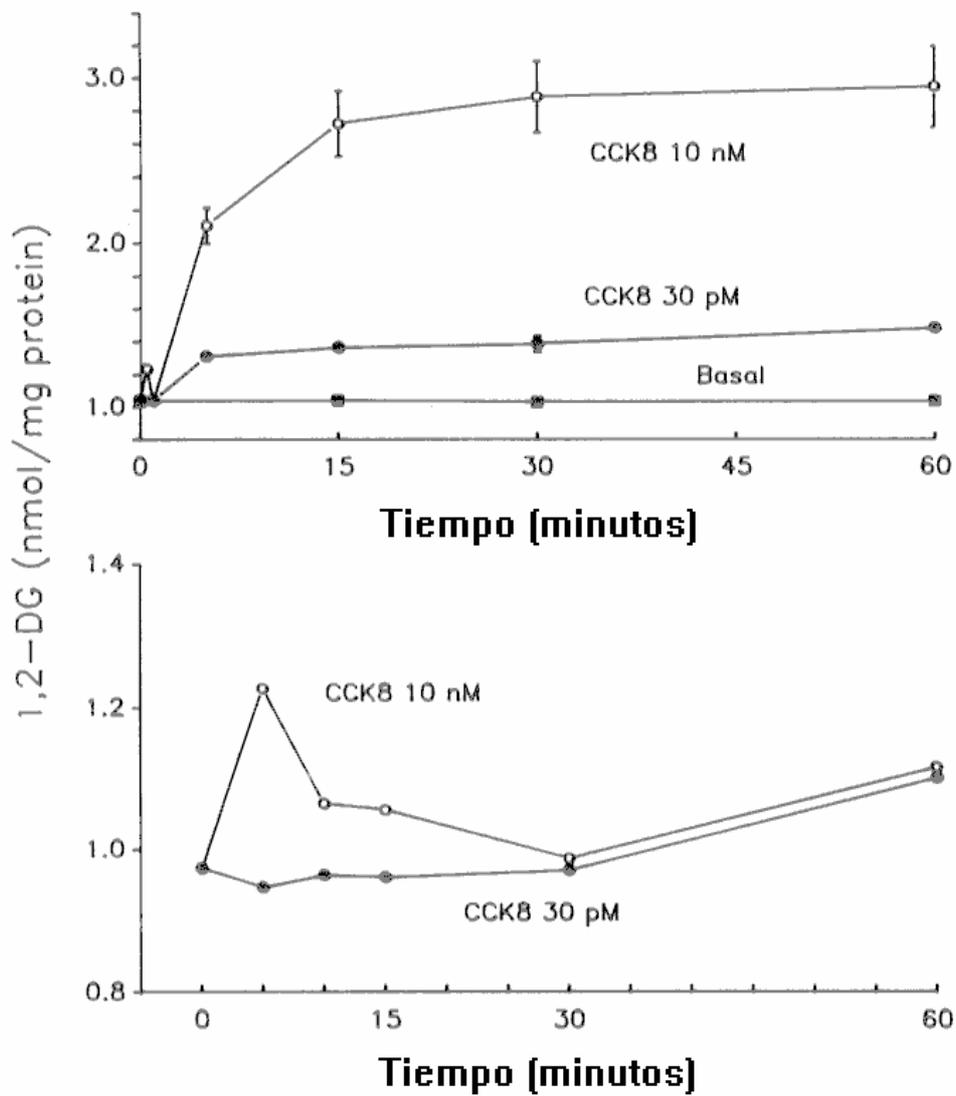


Figura 8. Gráfico que muestra la formación de DG en células acinares pancreáticas estimuladas por CCK. Tomado de: *Physiology of The Gastrointestinal Tract; Stimulus-Secretion Coupling in the Pancreatic Acinus*. Yule D.I. y Williams, J.A. pp 1447-1472.

La estimulación de las células acinares pancreáticas con dosis máximas de agonistas que median su acción a través de la PLC conduce a un incremento rápido en los niveles de DG. En la figura 8 se puede observar la variación en el tiempo de la producción de DG en las células acinares pancreáticas tras su estimulación con diferentes dosis de agonistas. A diferencia del IP₃, los niveles de DG permanecen elevados durante varios minutos; así tras la estimulación de los receptores colinérgicos y de la CCK en el páncreas exocrino aumenta la producción de DG (Bansbach y cols., 1974; Dixon y Hokin, 1984; Pandol y Schoeffield, 1986; Matozaki y Williams, 1989; Komabayashi y cols., 1990). Esta elevación es el resultado de dos procesos: tras una rápida elevación hay una segunda fase en la que se produce una constante y prolongada aparición de DG (Dixon y Hokin, 1984; Matozaki y Williams, 1989). Al igual que con la formación de IP₃, la generación de DG también presenta dependencia de la dosis de secretagogo que se emplea. A dosis bajas, con las que no se detectan cambios en los niveles de IP₃, el pico inicial no se observa y solamente se hace visible el incremento posterior. Este último incremento en el nivel de DG no se correlaciona totalmente con la hidrólisis del PIP₂ en términos tanto de magnitud, evolución en el tiempo o dependencia en la concentración de agonista. Existe la posibilidad de que el DG se forme a partir de la hidrólisis de otros fosfolípidos de membrana distintos de PIP₂, como por ejemplo la fosfatidilcolina (PC). Este hecho llevó a Bruzzone (1990) a proponer un modelo según el cual algunos agonistas producirían respuestas mediante la activación de la PKC sin generar IP₃, lo cual es posible si se hidrolizan PI y/o PIP. También sería posible si actúa una fosfolipasa C (PLC) que hidrolice la anteriormente citada PC (Loffelholz, 1989; Shukla y Halenda, 1991) ó bien una fosfolipasa D (PLD) (Pandol y cols., 1991) que lo genere a partir de PC, colina y ácido fosfatídico (AF). Así se generaría DG sin la aparición de señal de Ca²⁺.

El DG generado por los agonistas puede seguir dos rutas metabólicas (Jaken, 1989):

- una cinasa lo transforma en AF, para posteriormente incorporarlo a las rutas metabólicas de los fosfolípidos de inositol.
- separación de los ácidos grasos por acción de una lipasa (que separa el ácido graso del segundo átomo de carbono del glicerol).

Como ya hemos comentado antes, el DG ejerce su acción a través de una proteína cinasa presente en todos los tejidos, la PKC. Fue el grupo de Nishizuka el descubridor de esta cinasa a finales de los años 70, y observó que para su activación presenta dependencia de Ca^{2+} y fosfolípidos (Nishizuka, 1984). Debido a esta dependencia de fosfolípidos se piensa que la enzima es solamente activa cuando está asociada a la membrana celular (se trata de una enzima que en reposo se encuentra en el citosol y al ser activada se asocia a las membranas celulares, proceso conocido como “translocación”, si bien hay algunos tejidos en los que el proceso sucede a la inversa). La duración y el grado de unión depende del agonista y del tejido considerado (Niedel y Blackshear, 1986; Jaken, 1989; Rana y Hokin, 1990).

La PKC es una proteína ubicua de la cual se han descrito hasta 11 tipos o isoenzimas (α , β_I , β_{II} , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι y λ) hablándose hoy día de familia de la PKC. (Parker y cols., 1989; Nishizuka, 1992). Las diferencias existentes entre ellas y su sensibilidad al Ca^{2+} y al DG dejan abierta la posibilidad a la existencia de mecanismos selectivos de estimulación de alguno de estos tipos por parte de diferentes agonistas celulares. La PKC fosforila gran variedad de sustratos en residuos de serina y treonina.

Existe gran número de indicios que apoyan la idea del papel que la PKC pudiera tener en la regulación de la secreción de enzimas en las células acinares pancreáticas. Tanto formas permeables de DG como los ésteres del forbol, en particular el TPA (13,acetato de 12,O-tetradecanoil forbol), que presentan una estructura parecida a la del DG, estimulan la secreción de enzimas y aumentan la estimulada por Ca^{2+} en células intactas (Hootman y Williams, 1987; Bruzzone, 1990).

Una estimulación prolongada de la enzima con ésteres de forbol se sabe que reduce la actividad de la misma, proceso conocido con el nombre de “down regulation”, que consiste en una reducción de la cantidad de enzima. Se cree que esto tiene relación con la proteólisis de la molécula (Niedel y Blackshear, 1986; Jaken, 1989), que libera la zona catalítica y aumenta la actividad fosforiladora. Otra modificación experimentada por la PKC es un proceso de autofosforilación (Jaken, 1989), que incrementa su actividad, por lo que es posible un mecanismo de retroalimentación.

Las funciones propuestas para la PKC en las diferentes respuestas celulares son muy amplias (Nishizuka, 1988; Rana y Hokin, 1990). Hay una gran cantidad de datos que muestran su papel inhibidor de la señal de Ca^{2+} en diversos modelos, incluyendo la secreción pancreática (Arita y cols., 1991). En esta última se ha propuesto como punto de interacción la liberación del Ca^{2+} y la inactivación de receptores y/o las proteínas G.

Los ésteres de forbol pueden estimular la actividad de la bomba de Na^+ (Na^+/K^+ ATPasa) de las células acinares pancreáticas (Hootman y Williams, 1987), además de la salida de Ca^{2+} citosólico (Muallem, 1989). También se ha descrito un incremento en los niveles de ácido araquidónico a cargo de la PKC, a través de la activación de la PLA_2 (Pandol y cols., 1991). La actividad del intercambiador Na^+/H^+ se ve estimulada por su fosforilación en respuesta a la estimulación de las células con factores de crecimiento, ésteres de forbol, ácido ocadáico y suero fetal bovino, y se ha implicado en esta fosforilación a la PKC (Yun y cols., 1995).

En otros modelos, por el contrario, parece tener una acción cooperadora, ya que puede activar canales de entrada de Ca^{2+} extracelular dependientes de voltaje (Rana y Hokin, 1990); esto no ocurre en el páncreas exocrino, en donde estos canales no existen. Esta cooperación entre Ca^{2+} y PKC ha dado lugar a la propuesta de Rasmussen y cols. (1986) según la cual, tras actuar inicialmente el Ca^{2+} liberado por el IP_3 , la respuesta estaría apoyada por la actividad de la PKC (estimulada por este mismo Ca^{2+}).

Otro papel asignado a la PKC es la modulación del sistema del AMPc. Swandito y cols. (1989) trabajando con acinos pancreáticos observaron que el TPA produce un incremento en los niveles de AMPc citosólico inducidos por VIP, y proponen que se debe a una modulación de las proteínas G_s o G_i controladoras de la AC.

2.5.2.4.- Nucleótidos cíclicos.

2.5.2.4.1.- Adenosina monofosfato cíclica.

Junto con la vía del Ca^{2+} , el AMPc parece jugar un importante papel en la regulación de las respuestas secretoras pancreáticas (Gardner y Jensen, 1981; Hootman y Williams, 1987). Este hecho se basa en las siguientes evidencias:

- varias hormonas y neurotransmisores, que estimulan la secreción fluida y de proteínas, producen un incremento en los niveles de AMPc.
- análogos sintéticos del AMPc tales como el dibutilil AMPc o el 8-Br AMPc, estimulan también la secreción de proteínas y electrolitos en células pancreáticas.
- la estimulación de la AC o la inhibición de la fosfodiesterasa conducen ambas a un incremento en la actividad secretora de las células acinares (Schulz y Stolze, 1980; Pearson y cols., 1981; 1984; Petersen, 1982; Williams, 1984; Williams y Hootman, 1986).

Los péptidos de la familia de la secretina (secretina-VIP-glucagón) estimulan la secreción en las células acinares pancreáticas mediante la modulación de la vía del AMPc. En suspensiones de acinos pancreáticos (Korman y cols., 1980) o de células aisladas (Robberecht y cols., 1976) de cobaya, tanto la secretina como el VIP incrementan los niveles de AMPc citosólico de entre 8 a 30 veces el basal. En presencia del inhibidor de la fosfodiesterasa 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) se produce un mayor incremento en los niveles de este nucleótido cíclico (Gardner y cols., 1982). La elevación observada en los niveles de AMPc en respuesta a secretina y VIP es el resultado de la activación de la adenilato ciclasa localizada en la membrana de las células acinares pancreáticas, conclusión apoyada por estudios bioquímicos y citoquímicos (Rutten y cols., 1972; Long y Gardner, 1977; Robberecht y cols., 1982). La CCK también puede activar la AC cuando es administrada a muy elevadas concentraciones (Bruzzone, 1990).

Recientemente se han encontrado moléculas endógenas que presentan actividad vía AMPc; un péptido, localizado en células intestinales y en cerebro, el PHI, el factor hipotalámico liberador de la hormona del crecimiento (rhGRF) y el polipéptido pituitario activador de la adenilato ciclasa (PACAP-38), incrementan los niveles de AMPc en el cobaya, presumiblemente actuando sobre los receptores del VIP (Jensen y cols., 1981; Pandol, 1984; Raufman y cols., 1991).

Compuestos que estimulan la actividad de la ciclasa o los que inhiben la de la fosfodiesterasa también afectan al metabolismo del AMPc. La toxina del cólera es capaz de elevar los niveles de AMPc en acinos pancreáticos de cobaya (Gardner y Rottman, 1979) y de rata (Smith y Case, 1975; Pan y cols., 1982) por modificación covalente de su proteína G_s. La forskolina, un diterpeno aislado de una raíz (*Coleus*), es un potente activador de la AC, elevando hasta 30 veces los niveles de AMPc citosólico en células pancreáticas de rata (Heysler, 1983).

Los inhibidores de la fosfodiesterasa como la IBMX, la teofilina y el Ro 20-174 presentan, por sí mismos, pequeños efectos sobre el metabolismo del AMPc; pero son capaces de potenciar en gran medida los efectos que sobre éste presentan la secretina o el VIP (Koeman y cols., 1980; Gardner y cols., 1982).

Este papel no es solo aplicable al tejido acinar propiamente dicho, sino que el AMPc también es un mensajero en el caso de las células ductulares del páncreas (Folsch y Creutzfeldt, 1976; Schulz, 1987), en las que además es más sensible la estimulación con secretina (Milutinovic y cols., 1977), siendo el mensajero intracelular limitante para la producción de fluido y electrolitos en el páncreas (Kempen y cols., 1975). También hay una serie de secretagogos que pueden inhibir la vía del AMPc, como ocurre con la somatostatina “in vivo” (Rutten y cols., 1972; Esteve y cols., 1983; Singh, 1985;) y la ACh (Singh, 1983).

El mecanismo efector de este nucleótido cíclico es la activación de una cinasa dependiente de AMPc, la PKA. Se la ha localizado en el tejido pancreático y la secretina y el VIP, pero no la CCK, incrementan su actividad (Jensen y Gardner, 1978; Holian y cols., 1980). Existe menos información para el patrón de fosforilación producido por la PKA que en el caso de las cinasas activadas por la ruta de los fosfolípidos de inositol; se sabe que fosforila una serie de proteínas en las células del páncreas, de identidad desconocida y diferentes a las que se fosforilan por el Ca²⁺ y la PKC (Hootman y Williams, 1987).

2.5.2.4.2.- Guanosina monofosfato cíclica (GMPc).

Otro posible mensajero intracelular es el GMPc. Sus niveles intracelulares se incrementan tras la estimulación con ACh, CCK y los ionóforos de Ca^{2+} (Christophe y cols., 1976; Kapoor y Krishna, 1978), aunque su papel en la secreción pancreática está bastante menos establecido que el del AMPc (Tremblay y cols., 1988). La elevación de los niveles citoplasmáticos de GMPc, mediante el empleo de derivados no metabolizables como dibutilil GMPc o el 8-Br GMPc, o activando la guanilato ciclasa con nitrosourea o nitroprusida, no presenta efectos sobre el flujo de Ca^{2+} ni la secreción de amilasa (Gunther y Jamieson, 1979; Menozi y cols., 1989).

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

Este nucleótido se forma por la acción de la enzima guanilato ciclasa y es metabolizado por una fosfodiesterasa de manera similar a como ocurre con el AMPc. Igualmente, existe una cinasa dependiente de GMPc, análoga a la PKA para el AMPc, que media su acción (Hardman y Sutherland, 1969; Tremblay y cols., 1988).

2.5.2.5.- Acido araquidónico (AA).

Cuando se estimula el páncreas con un secretagogo, es posible la formación de otros metabolitos además de DG, a partir de este último. Diversos autores han descrito que tras la administración de los secretagogos se produce un incremento en la producción de AA (Halenda y Rubin, 1982; Dixon y Hokin, 1984; Pandol y cols., 1991). Este compuesto es liberado secuencialmente a partir de los fosfatos de inositol tras la actuación secuencial de una PLC y una diglicérido lipasa. A concentraciones elevadas de secretagogos también se activa la PLA_2 , que hidroliza PC además de otros fosfatos de inositol, generando AA.

La adición de AA a acinos pancreáticos “in vitro” estimula ligeramente la secreción de amilasa (Pandol y cols., 1991) e incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ independientemente

de IP₃ (Tsunoda y Owyang, 1995). En acinos pancreáticos de rata, este compuesto es capaz de incrementar la secreción de amilasa solamente cuando se administra a elevadas concentraciones (Stenson y Lobos, 1982). Pero también se han descrito efectos inhibidores sobre la secreción pancreática (Chaundhry y cols., 1988; Maruyama, 1990). Estos estudios revelan que la inhibición producida por la administración de AA se produce como resultado de una disminución en la producción de PIP₂ e IP₃ inducida por los secretagogos.

El AA es metabolizado en las células acinares por una ciclooxigenasa y una lipoxigenasa, dando lugar a la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (Banschbach y Hokin-Neaverson, 1980; Stenson y Lobos, 1982; Dixon y Hokin, 1984). Hay un trabajo en el que se describe que un inhibidor de la 5-lipoxigenasa, el AA861, bloquea la secreción de amilasa estimulada por CCK, carbacol y bombesina (Marshall y cols., 1982). A pesar de ello, actualmente no existen evidencias claras que impliquen a las prostaglandinas y leucotrienos como mensajeros intracelulares en las células acinares pancreáticas.

2.5.3.- Acciones de los mensajeros intracelulares: efectores.

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

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

2.5.3.1.- Proteína cinasa C.

Esta proteína, identificada como una cinasa dependiente de Ca²⁺ y fosfolípidos para su activación, es activada por DG (Nishizuka y cols., 1984), y ya hemos hablado de

ella cuando nos referimos al papel del DG como segundo mensajero en las respuestas del páncreas exocrino a la estimulación con secretagogos.

2.5.3.2.- Cinasas activadas por nucleótidos cíclicos.

Aunque es posible para algunos mensajeros intracelulares unirse y activar directamente una proteína, como es el caso del ion Ca^{2+} y la gliceraldehido deshidrogenasa mitocondrial (Rasmussen y Barret, 1984) o los canales iónicos activados directamente por este mismo ion, la mayoría de las acciones de estos se inician en un receptor intracelular.

Todos los efectos conocidos del AMPc están mediados por una proteína cinasa, la PKA (Krebs y Beavo, 1979; Taylor y cols., 1990). La unión del AMPc a la subunidad reguladora de la cinasa lleva a su disociación y activación de la subunidad catalítica. En el páncreas de rata, cobaya, ratón y conejo ha sido posible detectar la activación de cinasas por nucleótidos (Cenatiempo y cols., 1975; Jensen y Gardner, 1978; Burnham y Williams, 1984).

De la PKA se han encontrado dos isoformas en el páncreas, además de en otros tejidos (Nigam y Blobel, 1989), capaces de fosforilar histonas tipo II y III exógenas. Además también son capaces de fosforilar proteínas pancreáticas endógenas (Freedman y Jamieson, 1982; Burnham y Williams, 1984; Ederveen y cols., 1989). A pesar de que se han realizado innumerables estudios, los sustratos de la cinasa activada por AMPc no son bien conocidos.

Para el caso del otro nucleótido cíclico, el GMPc, para el que se ha descrito implicación en el acoplamiento estímulo-secreción en el páncreas exocrino actualmente se tiene incluso menos información que para el anterior, aunque Jensen y Gardner (1978) fueron capaces de diferenciar cinasas activadas por AMPc y GMPc.

2.5.3.3.- Ca^{2+} -calmodulina.

La mayoría de las acciones del calcio se inician con su unión a enzimas que no presentan actividad catalítica. A excepción de la troponina del músculo esquelético, la proteína más abundante a la que se une el ion Ca^{2+} es la calmodulina, a la cual ya nos

hemos referido en otro apartado de esta introducción cuando hablamos de los mecanismos efectores del Ca^{2+} .

2.5.3.4.- Fosfatasas.

La fosfatasas tienen implicación en la regulación de los procesos celulares ya que el estado de fosforilación de las proteínas celulares es el resultado del equilibrio existente entre la actividad de las cinasas y fosfatasas (Cohen y Cohen, 1989). En las células eucariotas se han encontrado hasta cuatro clases diferentes de fosfatasas específicas para serina/treonina: 1, 2A, 2B y 2C. Se ha visto que la tipo 2B es dependiente de Ca^{2+} , que la 2C es dependiente de Mg^{2+} , y que la tipo 2A no depende de cationes divalentes. Recientemente, mediante el empleo de inhibidores, como el ácido ocaídico, se han podido identificar mejor los tipos existentes de fosfatasas (Bialojan y Takai, 1988). Estas fosfatasas se encargan de defosforilar distintas fosforilasas cinasas, así como sustratos protéicos fosforilados.

En el páncreas de rata se han encontrado los tipos 1 y 2 de fosfatasa (Burnham, 1985). Sus sustratos en el páncreas exocrino no se han podido identificar, pero parece posible que sean responsables de los procesos de defosforilación activados por los secretagogos; recientemente se ha descrito la presencia del tipo 2A en el páncreas de rata, donde se ha mostrado responsable de la defosforilación del receptor de la CCK (Wagner y cols., 1992).

El empleo de inhibidores de la actividad de las fosfatasas ha demostrado tener efectos sobre los procesos de secreción en el páncreas exocrino; así, el ácido ocaídico, a concentraciones del rango de micromolar, inhibe la secreción de amilasa estimulada por CCK, carbacol y bombesina (Wagner y cols., 1992b). Su efecto se ha relacionado con los últimos pasos en el proceso de acoplamiento estímulo-secreción, ya que sus efectos manifestaron tener una pequeña inhibición sobre el metabolismo de los fosfolípidos de inositol.

2.5.3.5.- Fosforilación de proteínas.

Mediante el empleo de ^{32}P para marcar el ATP de la célula se han podido encontrar proteínas cuyo estado de fosforilación se modifica en respuesta a los secretagogos y a los mensajeros intracelulares.

En acinos pancreáticos de rata y ratón, se ha encontrado una fosfoproteína identificada como proteína ribosomal S6. Es una proteína de 32 kD cuya fosforilación, que podría estar implicada en la síntesis de proteínas, aumenta tras la estimulación con CCK, carbacol, secretina e insulina (Burnham y Williams, 1982; Freedman y Jamieson 1982a; 1982b; Jahn y Soling, 1983; Vandermeers y cols., 1984).

Otra fosfoproteína implicada en la síntesis de proteínas y regulada por los secretagogos en los acinos pancreáticos es el factor de elongación 2 (Nairn y Palfrey, 1987). Es una proteína soluble de 95-100 kD regulada específicamente por la cinasa III activada por el complejo Ca^{2+} -calmodulina. Su fosforilación ha revelado conducir a la inhibición de la síntesis de proteínas.

Otras proteínas reguladas por los secretagogos en las células acinares pancreáticas son la cadena ligera de miosina (Burnham y cols., 1988), el receptor de la CCK (Klneppelberg y cols., 1991), la fosfocolina citidil transferasa (CTP) (Grobowski y cols., 1992), etc. Incluso existe fosforilación de proteínas que aun no se han podido identificar (Burnham y cols. en sus investigaciones aluden a nueve proteínas solubles que son reguladas en respuesta a la estimulación por carbacol y CCK). En acinos pancreáticos de ratón y cobaya el TPA y el ionóforo del Ca^{2+} A23187 alteran la fosforilación de diversas proteínas implicadas en las rutas metabólicas de distintos secretagogos.

También se ha sugerido que la actividad tirosina cinasa está implicada en el control de la secreción y de los segundos mensajeros, ya que hay pruebas de que mediante el empleo de inhibidores de estas tirosinas cinasas se han podido inhibir las respuestas pancreáticas a la estimulación con secretagogos (Lutz y cols., 1993). Otra evidencia que implica a las tirosinas cinasas en las respuestas a secretagogos es el hecho de que la aplicación de fosfatasas específicas de tirosinas a células acinares

permeabilizadas incrementa la secreción de amilasa dependiente de Ca^{2+} (Jena y cols., 1991).

Sobre los secretagogos que actúan sobre la vía del AMPc y la fosforilación de proteínas se han realizado pocos ensayos hasta la fecha. La secretina y el VIP aumentan la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Freedman y Jamieson, 1982; Vanderneers y cols., 1984).

La integración y potenciación de los mecanismos intracelulares se produce en gran medida al nivel de las cinasas y fosfatasas y las proteínas que éstas regulan. De gran importancia en el futuro será la identificación de las proteínas implicadas directamente en los procesos de exocitosis.

2.5.4.- Interacciones entre secretagogos en el páncreas exocrino.

Hace más de una década que se postuló en el páncreas exocrino la existencia de potenciación entre diferentes secretagogos. Por potenciación se entiende la interacción entre dos agentes estimulantes, fruto de la cual la respuesta celular es mayor que la suma de las respuestas obtenidas si ambos agentes se administran por separado.

Gardner y Jensen (1981) describieron en la secreción pancreática dos patrones básicos de interacción entre secretagogos: al lado de la mencionada potenciación al emplear agentes que actúan a través de distintas vías de acoplamiento estímulo-secreción, indicaron que dos agentes que activen el mismo mecanismo no presentan potenciación, y ni siquiera aditividad, si se administran a dosis máximas; además existe dependencia de las dosis utilizadas. Estudios posteriores en nuestro laboratorio han revelado que la aplicación simultánea de varios secretagogos no induce una respuesta pancreática potenciada (Francis y cols., 1990; Salido y cols., 1992; González y cols., 1993; Camello y cols., 1994).

La interacción entre secretagogos es un fenómeno muy concreto que se observa tan solo en algunas respuestas celulares (Burnham y cols. 1984), y presenta cierta dependencia en cuanto al tiempo. Gardner y Jensen (1981) describen cómo su aparición, en el caso del efecto del VIP sobre la respuesta a la CCK, precisa que ambos agentes se administren simultáneamente.

Finalmente hay que añadir que la potenciación se produce en la respuesta del páncreas, y no en los factores intracelulares que llevan a ella (Collen y cols., 1982), y que incluso la interacción entre secretagogos puede llevar a la desensibilización del páncreas (Gardner y Jensen, 1981). Este fenómeno consiste en una reducción de las respuestas a un agonista cuando previamente se ha sometido al tejido a la acción de ese mismo agente o de otro agonista. El significado fisiológico se ha señalado como un medio de modular las respuestas a concentraciones excesivamente elevadas de los secretagogos.

2.6.- Importancia del ion Mg^{2+} en la secreción pancreática.

El ion Mg^{2+} está implicado en numerosos procesos celulares fisiológicos y bioquímicos: es cofactor para más de 300 enzimas (Wacker, 1968; 1980), participa en los procesos de síntesis de ARN y ADN (Henrotte, 1993), en la contracción muscular (Altura y Altura, 1995), en la secreción de enzimas (Neilsen y Petersen, 1972; Francis y cols., 1990; Wisdom y cols., 1995) y hormonas (Curry y cols., 1977; Backer y Knight, 1978). También se ha demostrado su participación en la regulación de las actividad de los sistemas de transporte de diversos iones (Na^+/K^+ ATPasa, Ca^{2+} -ATPasa, K^+/H^+ -ATPasa, los transportadores $Na^+/K^+/Cl^-$, Na^+/Cl^- y los intercambiadores Ca^{2+}/Na^+ y HCO_3^-/Cl^- , así como la regulación de canales para Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) (Squire y Petersen, 1987; Agus y cols., 1989; Flatman, 1984; 1990; 1993). Además participa en otros procesos metabólicos celulares (síntesis de proteínas) y en el mantenimiento de propiedades estructurales de la célula (estabilización de las membranas y potenciales eléctricos) (Birch, 1993).

El ion Mg^{2+} lo podemos encontrar en la célula en dos formas: ionizado o libre y unido a componentes del citosol celular. Es el Mg^{2+} en la forma ionizada el regulado por medio de los sistemas de transporte. Así, ha sido posible determinar la concentración de Mg^{2+} libre citosólico ($[Mg^{2+}]_i$) empleando técnicas como la resonancia magnética nuclear (NMR) (Gupta y cols., 1978; Flatman, 1980; Corkey y cols., 1986; Levy y cols., 1988), microelectrodos (Alvarez-Leefmans y cols., 1987) e indicadores fluorescentes (Raju y cols., 1989).

Su concentración en la mayoría de las células animales varía entre 0,2 y 1 mM, lo cual, representa menos del 10% del contenido total de Mg^{2+} . En estas células la $[Mg^{2+}]_i$ se mantiene por debajo del valor que debería tener en función del equilibrio electroquímico, siendo la concentración de Mg^{2+} extracelular ($[Mg^{2+}]_o$) de aproximadamente 0,5 mM (Flatman, 1984).

El Mg^{2+} se libera junto con enzimas digestivas en las secreciones salival (Nielsen y Petersen, 1972) y pancreática (Sullivan y cols., 1974), y se cree que está distribuido en microsomas (Clemente y Meldolesi, 1975) y gránulos de zimógeno. Las membranas de estos últimos parece presentar requerimientos de Mg^{2+} para los procesos de hidrólisis de nucleótidos y los di y trifosfatos.

La modificación de los niveles extracelulares de Mg^{2+} no presenta efectos cuantificables sobre la secreción basal de jugo pancreático, pero parece tener una fuerte influencia sobre la secreción de enzimas y jugo pancreático en respuesta a los secretagogos (Lennard y cols., 1989; Wisdom y cols., 1995) o tras la activación nervios intrínsecos (Wisdom y cols., 1994; Juma y cols., 1995). Una elevada $[Mg^{2+}]_o$ inhibe la secreción pancreática inducida por la estimulación con secretagogos, mientras que una baja $[Mg^{2+}]_o$ presenta el efecto contrario (Lennard y cols., 1989). Finalmente variaciones en la $[Mg^{2+}]_o$ llevan a que se produzcan cambios en la $[Mg^{2+}]_i$ que además parece tener implicaciones importantes en los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción. Una alta $[Mg^{2+}]_o$ conduce a un incremento en la $[Mg^{2+}]_i$, mientras que cuando su concentración en el medio extracelular es reducida la intracelular disminuye ligeramente (Lennard y Singh, 1991; 1992; Wisdom y cols., 1995).

La estimulación de células acinares pancreáticas con ACh, CCK y carbacol conduce a una disminución en la $[Mg^{2+}]_i$, sin embargo la estimulación con adrenalina o noradrenalina no presenta efectos significativos sobre este parámetro (Lennard y Singh, 1991). Estos autores concluyen que las variaciones detectadas en la $[Mg^{2+}]_i$ podrían tener alguna relación con la salida que ellos detectan de este ion en el perfundido procedente de segmentos pancreáticos.

2.6.1.- Aspectos espaciotemporales de la señal de Mg^{2+} .

Además de por el empleo de la NMR y la espectrofotometría de absorción atómica, el conocimiento de la homeostasis del ion Mg^{2+} ha venido mejorado por el desarrollo de indicadores fluorescentes sensibles a la concentración de Mg^{2+} , mag-fura-2 (Raju y cols., 1989; Lennard y Singh, 1990) y mag-fura-5 (Illner y cols., 1992), lo que permite corroborar y ampliar los conocimientos que se habían adquirido por las técnicas aplicadas con anterioridad.

Las células acinares pancreáticas presentan la característica de ser polarizadas. En condiciones de reposo, la fluorescencia emitida por las células cargadas con mag-fura-2 no es uniforme a lo largo de toda la superficie de la célula, indicando que el ion Mg^{2+} no está uniformemente distribuido en las células acinares pancreáticas. Así, se ha encontrado la mayor intensidad de fluorescencia, es decir predominio de contenido de Mg^{2+} , en el polo secretor cuando las células no eran estimuladas. Tras la estimulación con CCK se produce un incremento en la $[Mg^{2+}]_i$ en toda la célula, lo que viene a durar unos 30 segundos, y se presenta la mayor intensidad de fluorescencia en el polo secretor comparado con el basal. Progresivamente, la fluorescencia emitida disminuye hacia valores basales y se sigue de una reducción a lo largo de toda la membrana basolateral (Wisdom y cols., en prensa).

2.6.2.- Mecanismos de transporte de Mg^{2+} .

Estudios iniciales sobre los mecanismos que podrían participar en el transporte de este ion sugirieron que era bastante difícil cambiar el contenido celular de Mg^{2+} . Para aclarar dudas sobre este proceso se incubaron diversos tipos de células durante largos períodos de tiempo en presencia tanto de altas concentraciones del ion como en presencia de quelantes, sin que se produjeran importantes modificaciones en el contenido total de Mg^{2+} . Este hecho, junto con los resultados observados en estudios en los que $^{28}Mg^{2+}$ se equilibraba lentamente a través de las membranas celulares, llevó a la conclusión de que la permeabilidad de la membrana para este ion era baja (Flatman, 1984; 1988) y que no existían mecanismos específicos para el transporte de Mg^{2+} .

Tras la realización de diferentes estudios que intentaban caracterizar el transporte de Mg^{2+} , se observó que es posible que en la célula la mayor parte de este ion se localice en algún depósito o bien unido a sustratos celulares. Esta conclusión dependía del hecho de que el tratamiento de las células con el ionóforo A23187, en presencia de elevadas concentraciones de Mg^{2+} en el medio extracelular, no conducía a su redistribución en el citosol celular (Fera y Garay, 1986; Gunther y cols., 1990). Además, de los estudios realizados por Romaní y Scarpa (1992) se desprende la posibilidad de que el depósito intracelular para el ion Mg^{2+} sea la mitocondria.

Las nuevas técnicas empleadas han permitido realizar un examen más detallado sobre la homeostasis del ion Mg^{2+} y muestran suficientes evidencias acerca de la existencia de sistemas específicos del transporte de Mg^{2+} en las células animales. En estudios que utilizaban determinaciones mediante espectroscopía de absorción atómica, se encontró que la estimulación con secretagogos (ACh y CCK), así como la estimulación eléctrica, tenían como resultado un aumento significativo en la salida de Mg^{2+} al efluente de segmentos pancreáticos. La estimulación con secretina tenía como resultado una entrada de Mg^{2+} al tejido (Singh y cols., 1992; Wisdom y cols., 1994).

Los métodos de espectroscopía también se han empleado para caracterizar el transporte de Mg^{2+} en eritrocitos (Feary y Garay, 1986; Flatman y Smith, 1990; Gunther y cols., 1990), así como en células acinares pancreáticas (Wisdom y cols., 1993a, 1993b; 1995). En estas células se ha encontrado una dependencia de Na^+ para el transporte de Mg^{2+} (Wisdom y cols., 1995), pero este proceso no se ve afectado por el tratamiento con antagonistas de los canales de Ca^{2+} (diltiazem, verapamil o gallopamil) (Lennard, 1991). La existencia de un mecanismo de transporte de Mg^{2+} dependiente de Na^+ ya había sido descrita anteriormente en el axón gigante del calamar, en células musculares de percebes y en sinaptosomas (Heinonen y Åkerman, 1987). La fuente de energía para el funcionamiento de este transportador no está muy clara. Existen evidencias que apoyan la idea de que la energía la proporcionan los gradientes de Na^+ y Mg^{2+} , y que el ATP sería necesario únicamente para mantener el transportador en un estado de fosforilación, activo, de manera que actuaría de manera catalítica más que como fuente de energía (Mullins y cols., 1977). Así se asume que el transporte de Na^+ siguiendo su gradiente hace que el transportador permanezca en un estado de alta

energía y, esta energía es la que se utiliza posteriormente para el transporte de Mg^{2+} (Flatman, 1991).

Resultados que apoyan la existencia de un transporte de Mg^{2+} dependiente de Na^+ se han obtenido en ensayos en los que el tratamiento de células acinares pancreáticas, cargadas con altos niveles de Mg^{2+} , con bunetamida, SITS u ouabaina no presenta efectos sobre el transporte de este ion. Por el contrario, el tratamiento con dinitrofenol, amilorida, lidocaina o quinidina sí producían una reducción en la salida de Mg^{2+} de estas células. Estos resultados, junto con otros obtenidos en experimentos en los que el Na^+ del medio extracelular era sustituido por NMDG, Tris o colina, condiciones en las que la salida del ion al medio extracelular también se veía reducida, apoyan la idea de la existencia de un transporte de Mg^{2+} dependiente de Na^+ en las células acinares pancreáticas (Wisdom y cols., 1993a,b; Singh y Wisdom, 1995).

Se ha propuesto incluso la existencia de un intercambio Mg^{2+} - Mg^{2+} , aunque los ensayos realizados para su detección no han sido muy fructíferos (Flatman, 1991). Finalmente cabría la posibilidad de un transporte de Mg^{2+} independiente de Na^+ , como por ejemplo un antitransporte Mg^{2+}/H^+ o el simple transporte de Mg^{2+} sin implicar otros iones (uniport), como se ha sugerido en los casos en que se ha estudiado la regulación del nivel de Mg^{2+} en mitocondrias (Flatman, 1984; Diwan, 1987). Estos sistemas podrían existir claramente en diferentes tipos de membranas. La posibilidad de que el ion Mg^{2+} sea transportado junto con otros compuestos, es decir ligado a ellos (ATP o aminoácidos) ha recibido menos atención.

2.6.3.- Relacion entre Mg^{2+} y Ca^{2+} en la transduccion de señales en el pancreas exocrino.

Actualmente se piensa que el ion Mg^{2+} está estrechamente ligado a la movilización de Ca^{2+} tanto desde los depósitos intracelulares como el procedente del medio extracelular (Case, 1984; Singh y Wisdom, 1995). Por ejemplo, el metabolismo de los fosfolípidos de inositol (IP_3) que conduce a la liberación de Ca^{2+} desde un depósito intracelular depende de la actuación de la enzima 5-fosfatasa que, a su vez, depende del ion Mg^{2+} (Streb y Schulz, 1983; Sfeers, 1989). En aquellas condiciones en

las que la disponibilidad de Mg^{2+} es pequeña, la hidrólisis del IP_3 por esta enzima se ve reducida.

En el RS del músculo esquelético el canal que libera Ca^{2+} ha revelado ser sensible a la $[Mg^{2+}]_i$ (Meissner y cols., 1986), resultando inhibido a concentraciones de Mg^{2+} en el rango de mM. Por el contrario, cuando la $[Mg^{2+}]_i$ es baja el canal se muestra abierto (Capurro y Dormer, 1989).

En otros estudios se ha encontrado que modificando el nivel de Mg^{2+} en el medio extracelular se presentan marcados efectos sobre la entrada de Ca^{2+} en el citosol tras la estimulación de las células acinares pancreáticas con secretagogos, así como los cambios producidos por ellos en la $[Ca^{2+}]_i$ y en el patrón oscilatorio de este ion, de manera que una elevada $[Mg^{2+}]_o$ reduce estos fenómenos mientras que cuando es baja se ven facilitados (Francis y cols., 1990; Lennard y Singh, 1992; Wisdom y cols., 1994; 1995). Más específicamente se sabe que el ion Mg^{2+} es cofactor de la bomba de Ca^{2+} (Ca^{2+} -ATPasa) del RE, la cual se encarga de la acumulación de Ca^{2+} en este depósito y de devolver el nivel citosólico de este ion a los valores de reposo tras la estimulación con secretagogos (Scheurs y cols., 1976; Lambert y Christophe, 1978; Wacker, 1968; 1980; Brown y cols., 1987). Así el ion Mg^{2+} podría tener importantes implicaciones en a movilización de Ca^{2+} durante los procesos de secreción en el páncreas exocrino.

2.7.- pH intracelular.

A lo largo del proceso de selección natural han ido apareciendo diversos sistemas en los organismos que tienen la finalidad de mantener la acidez y/o alcalinidad de los fluidos corporales dentro de un rango bastante estrecho. Ello permite un control más ajustado de los procesos bioquímicos celulares ya que las reacciones catalizadas por enzimas se ven enormemente afectadas por cambios en la acidez del medio. Por ejemplo, cambiando la concentración intracelular de hidrogeniones (H^+) de $79 \cdot 10^{-9}$ mol/l a $63 \cdot 10^{-9}$ mol/l (un cambio de pH de 7'1 a 7'2) se incrementa casi 20 veces la actividad de la fosfofructocinasa, la enzima limitante de la velocidad de la glucólisis. También existen cambios importantes en la excitabilidad en el sistema nervioso cuando existen variaciones en este parámetro, cambios que podrían llevar a la muerte del individuo (Attwell, 1986).

El ion H^+ es tan reactivo con las proteínas y otros componentes celulares que su concentración (aproximadamente 10^6 veces menor que la de K^+ , 100 nmol/l) debe estar muy bien controlada, de lo contrario se verían afectados los procesos fisiológicos y bioquímicos de la célula. Para este fin existen sistemas tampón y transportadores de iones que se encargan de esta misión.

La principal función del páncreas exocrino es, como ya hemos comentado con anterioridad, la secreción de enzimas y un componente fluido, rico en HCO_3^- , de carácter alcalino. Cualquier movimiento de iones en un sentido u otro a través de la membrana implica un desplazamiento de cargas y por tanto una posible variación en el pH existente a ambos lados de la membrana, de manera que deben existir mecanismos encargados de la regulación de este parámetro.

Aunque la importancia bioquímica del pH intracelular (pH_i) se ha conocido desde hace mucho tiempo, solo recientemente se han podido determinar con exactitud los valores del pH y sus variaciones, así como la clarificación de los mecanismos implicados en su control, gracias al desarrollo de modernas técnicas. Los diferentes métodos de que se dispone actualmente para medir el pH_i indican que su valor está próximo al extracelular (pH_o), pero ligeramente más ácido; por lo general se acepta que el pH_i en las células del organismo está aproximadamente entre 6'9 y 7'4 (Roos y Boron, 1981).

Se ha sugerido que algunos cambios que se observan en el pH_i podrían tener un papel como mensajero intracelular, pero en la mayoría de los casos el pH_i es de tal importancia que es mantenido tan constante como es posible.

Asumiendo un valor de 7'4 para el pH del medio extracelular y 7'2 para el pH_i , el potencial de equilibrio para los iones H^+ (E_H) puede ser calculado a partir de la ecuación de Nernst:

$$E_H = \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[H]_o}{[H]_i}$$

donde $[H]_o$ y $[H]_i$ son las concentraciones externa e interna de protones. A 20°C se obtiene un valor de -11'6 mV (Thomas, 1986). Dado que el potencial de equilibrio para un ion es aquel al que los movimientos del mismo hacia uno y otro lado de la membrana celular son iguales, no es posible explicar un valor de pH_i determinado sin la existencia de algún mecanismo de transporte de iones. Dicho de otra manera, para un potencial de membrana de reposo de -60 mV y un pH_o de 7'4, el pH_i debería ser de 6'4, lo que cabría esperarse si los H^+ estuvieran distribuidos pasivamente a través de la membrana celular (Frelin y cols., 1988).

2.7.1.- Métodos para la determinación del pH_i .

Una de las primeras técnicas que se utilizó para la determinación del pH_i era la *homogeneización de tejidos* y determinación del pH por medio de un electrodo convencional. Esta técnica fue empleada por Michaelis y Davidoff en 1912 en eritrocitos. Los inconvenientes de este método eran que la producción de ácido láctico y CO_2 continuaban tras la ruptura de las células, se mezclaban el medio extracelular y el intracelular y se diluían los sistemas tampón de ambos medios, con lo que se estaban produciendo cambios en el pH que se pretendía determinar.

Otra técnica que se aplicó era la *distribución de ácidos o bases débiles*. Un ácido o una base débil, marcados, se añaden al medio en que se encuentran las células; una vez que se había alcanzado el equilibrio entre el interior y el exterior celular se calculaba la distribución del marcador (ácido o base) y posteriormente el pH, asumiendo que la membrana celular es únicamente permeable a las moléculas no cargadas (De Vries, 1871; Overton, 1902). El ácido débil más comunmente empleado es la 5,5-dimetil-4,4-oxazolidindiona (DMO). Este método se caracteriza por la facilidad con que se puede llevar a cabo, pero presenta inconvenientes como la lentitud que puede presentar la distribución del marcador a través de la membrana, transformaciones metabólicas de los ácidos y/o bases utilizados o que el grado de disociación del ácido o de la base en el medio intracelular no es conocido con exactitud.

Debido a que existen algunos pigmentos naturales que son sensibles a los cambios de pH, se desarrollaron *técnicas de colorimetría*, basadas en los cambios de color que estos experimentaban en determinadas condiciones. Para este fin De Vries (1871)

demonstró que la betacinina, un pigmento intracelular, cambiaba de color cuando se modificaba el pH. Al exponer fragmentos de remolacha roja a soluciones de NH_3 el color se volvía marrón y más tarde amarillo. Más tarde Metchnicoff (1893) observó que cuando unos protozoos ingerían un compuesto químico (tornasol) se observaba un cambio de color del azul hacia el rojo, de la misma manera que hacía Kite en 1913 en sus trabajos con amebas a las que les introducía distintos compuestos que le hicieron pensar que el medio interno de estos seres era neutro o ligeramente alcalino.

Posteriormente se han ido realizando nuevas aproximaciones y mejoras de las técnicas elaborando una serie de compuestos químicos fluorescentes sensibles a las variaciones de pH dando lugar al nacimiento a las *técnicas de fluorimetría*. Estos indicadores no atraviesan la membrana celular, con lo que tienen que ser inyectados o bien transformados químicamente añadiendo un radical (éster) en su molécula, lo que les permite atravesar fácilmente la membrana celular y, una vez en el citosol, quedar atrapados tras la hidrólisis por las esterasas celulares de éste. Esta técnica del uso de indicadores fluorescentes captados por las células fue introducida por Ohkuma y Poole en 1978, quienes la aplicaron al estudio del pH dentro de lisosomas de macrófagos mediante el empleo de dextrano marcado con isotiocianato de fluoresceína; este compuesto era excitado alternativamente con luz de longitud de onda de 495 y 450 nm y la fluorescencia emitida se medía a 519 nm. El cociente entre las fluorescencias emitidas a cada una de las dos longitudes de onda de excitación se tomaba como un índice del pH. Hoy día esta técnica emplea indicadores fluorescentes como la piranina o derivados de la fluoresceína (Frelin y cols., 1988). El derivado más comunmente utilizado hoy día es la biscarboxietilcarboxifluoresceína (BCECF). También se han utilizado otros indicadores fluorescentes como el 4MU (Graber y cols., 1986) y SNARF o el SNAFL (Lax y cols., 1994). Este método presenta las ventajas de no ser destructivo, no ser caro y permitir detectar cambios rápidos de pH que pueden variar entre 0'1 y 0'2 unidades de pH. El mayor inconveniente que presenta es que la calibración puede ser complicada, aparte del inconveniente que supone el introducir una molécula extraña en las células.

La *resonancia magnética nuclear* (^{31}P -NMR) también se ha empleado para la determinación del pH_i . Se basa en las propiedades magnéticas del núcleo del ^{31}P . Fue

empleada por primera vez en 1973 por Moon y Richards para la determinación de las variaciones de pH_i en eritrocitos. Es una técnica no destructiva y no invasiva, que presenta además la posibilidad de poder determinar variaciones de pH que ocurren con relativa rapidez. Por contra necesita una instrumentación compleja y gran preparación del investigador.

Para finalizar, otro método empleado es la determinación de pH_i mediante el uso de *microelectrodos sensibles al pH*. Se ha desarrollado multitud de clases de electrodos destinados a este fin, cada uno con características que les hacen más apropiados que otros, y esto va en función de su complejidad. Constan de dos electrodos, uno sensor y otro de referencia que se emplea para medir el potencial de membrana, y la técnica se basa en que la diferencia de voltaje existente entre ambos electrodos es función lineal del pH_i . Las ventajas de este método son su simplicidad y facilidad de calibración y la determinación continua del pH en un punto del interior celular (Roos y Boron, 1981).

La comparación entre las distintas técnicas con que actualmente se cuenta para la determinación de las variaciones de pH_i en las células animales debe tomarse con precaución, ya que cada una mide parámetros diferentes, por lo tanto se pueden encontrar discrepancias en los resultados obtenidos.

2.7.2.- Regulación del pH_i .

En la década de los años 20 y comienzo de la de los 30, estaba generalmente asumida la concepción de que los iones pequeños como los H^+ y el K^+ se distribuían a través de la membrana celular de acuerdo con el equilibrio de Donnan. Así la regulación del pH_i implicaría la redistribución de los iones de acuerdo con la relación

$$\frac{[\text{H}^+]_i}{[\text{H}^+]_o} = \frac{[\text{K}^+]_i}{[\text{K}^+]_o} = 10^{\left(\frac{-V_m F}{RT}\right)}$$

Fue en 1934 cuando Fenn y Cobb encontraron evidencias de que esto no sucedía de esa manera. Estos investigadores encontraron que el cociente $[\text{H}^+]_i/[\text{H}^+]_o$ es sustancialmente inferior al cociente $[\text{K}^+]_i/[\text{K}^+]_o$ cuando determinaron el pH_i en músculo

sartorio de la rana (el pH_i era bastante superior al que se predecía según la distribución de los iones K^+).

La posibilidad de que existieran mecanismos de transporte de iones no fue concebida hasta 1955 cuando Hill propuso la existencia de un mecanismo para la “extrusión” de los H^+ análogo a la bomba de Na^+ . Estos mecanismos compensadores, que habían sido propuestos por los primeros investigadores sobre el tema, deberían neutralizar no solamente los H^+ que entran pasivamente en la célula, sino también el ácido procedente de al menos otras dos fuentes: metabolismo y movimiento de formas ionizadas de ácidos y bases débiles existentes en las células (Roos y Boron, 1981).

2.7.2.1.- Regulación del pH_i a corto plazo: tampones intracelulares.

La estabilidad del pH_i requiere que el ácido producido sea retirado o tamponado tan pronto aparece. Cuando en la célula aparece una cantidad de ácido/base que está afectando al pH se ponen en marcha una serie de mecanismos relativamente rápidos que retiran o liberan H^+ minimizando así esta variación. Los principales mecanismos que participan en la regulación del pH_i a corto plazo son:

- tamponamiento químico, en el caso que las sales de ácidos y bases débiles se combinan con los H^+ para formar compuestos no disociados,
- transformación por rutas metabólicas de estos ácidos,
- translocación de ácidos y bases entre el citoplasma y el interior de los orgánulos celulares.

En conjunto estos mecanismos son capaces de tener controlado hasta el 99’99% de los ácidos y bases que aparecen en la célula. Quizás el más importante sea el tamponamiento químico, teniendo presente además que estos mecanismos únicamente reducen los cambios originados en el pH_i pero no impiden que se produzcan.

El tamponamiento químico es la capacidad que tienen los ácidos y bases débiles de reaccionar rápidamente con los H^+ libres del medio, de manera que reducen los cambios que estos puedan haber originado en el pH (Roos y Boron, 1981). La capacidad

de tamponamiento del medio intracelular fue cuantificada por primera vez por Henderson (1908) y Washburn (1908), quienes establecieron que un ácido débil ejerce su mayor poder de tamponamiento cuando la $[H^+]$ iguala su constante de disociación; pero esta definición se comprobó únicamente empleando ácidos que cumplieran esta condición en soluciones neutras. Michaelis en 1922 propuso la definición de capacidad de tamponamiento intracelular que hoy es aceptada: *cantidad de una base fuerte que hay que añadir a una solución tamponada para producir una pequeña variación de su pH*, y viene expresada por la fórmula:

$$b = \frac{dB}{dpH}$$

La capacidad de tamponamiento del medio intracelular se puede cuantificar observando a lo largo del tiempo la variación producida en el pH_i tras una carga ácida o alcalina de magnitud conocida (Roos y Boron, 1981). Así, va a reflejar la contribución de varios mecanismos de homeostasis. Estos procesos se producen con rapidez y, normalmente, de manera reversible minimizando la caída inicial del pH_i , pero la contribución de cada uno de ellos de manera individual es difícil de establecer; las reacciones implicadas en el tamponamiento químico son de tipo iónico y se producen en fracciones de segundo. La transformación por medio de reacciones metabólicas necesitan un poco más de tiempo para llevarse a cabo, pero aun así se completan en varios segundos. También se incluye el tamponamiento realizado por los orgánulos citoplasmáticos. Estos mecanismos se producen en la célula casi simultáneamente.

Existen otros mecanismos (transporte de iones) que posteriormente devuelven el pH_i a su valor normal después de que los mecanismos para el tamponamiento intracelular han actuado; así, esta recuperación del pH_i no se considera parte de los sistemas de tamponamiento. Estos mecanismos de transporte de iones a través de la membrana celular son relativamente lentos. Por ejemplo, son necesarios aproximadamente 15 minutos para la recuperación completa del pH_i después de una carga ácida en células de músculo sóleo de ratón (Aickin y Thomas, 1977), y aun más tiempo en el caso de fibras musculares de percebe (Boron y cols., 1979).

El transporte de iones a través de la membrana celular se puede distinguir en función de su respuesta a la administración de inhibidores, de las variaciones del pH_i en el tiempo y la especial característica de ser sensible a factores como el pH , la $[\text{HCO}_3^-]$ y/o la $[\text{Na}^+]$ extracelulares (Roos y Boron, 1981).

2.7.2.2.- Regulación del pH_i : mecanismos de extrusión de ácido.

Mientras que los sistemas de tamponamiento de los que dispone la célula minimizan en cortos períodos de tiempo los cambios que se producen en el pH_i , cualquier recuperación o restauración del pH_i de reposo requiere algún tipo de transporte activo de iones. La mayoría de los estudios realizados sobre los mecanismos de regulación del pH_i se han centrado en la recuperación tras una acidificación artificial del citoplasma, gracias a lo cual se ha podido sugerir la presencia de diferentes sistemas de transporte de iones en la membrana celular.

2.7.2.2.1.- Intercambiador Na^+/H^+ .

Representa el mecanismo más ampliamente estudiado como sistema responsable de la regulación del pH_i en las células animales, y está presente en todos los tipos de células que se han estudiado hasta la fecha. Su misión es el intercambio del ion Na^+ por H^+ de manera reversible y electroneutra. La fuerza que hace funcionar este intercambiador es el gradiente de concentración de Na^+ a través de la membrana celular. En condiciones fisiológicas funciona como un sistema alcalinizador del medio intracelular.

Este sistema se encontró por primera vez en la membrana del borde en cepillo de células intestinales y de riñón hace ya 20 años (Murer y cols., 1976), y en células acinares pancreáticas en 1985 por Hellmessen y cols., para posteriormente ser objeto de estudio en otra serie de investigaciones sobre diferentes tipos celulares (Bastie y cols., 1988; Peral y cols., 1995) entre ellos las células acinares pancreáticas (Muallem y Loessberg, 1990). Aparte de su función como regulador del pH_i , está implicado en otras funciones como el transporte transcelular de Na^+ , regulación del volumen celular y probablemente la proliferación celular (Aronson e Igarashi, 1986; Grinstein y cols., 1989).

Su actividad depende tanto de la concentración de Na^+ en el medio extracelular ($[\text{Na}^+]_o$) como del pH_o . La salida de H^+ y entrada de Na^+ a través del transportador se incrementa cuando la $[\text{Na}^+]_o$ es elevada; lo mismo ocurre cuando el pH_o es alcalino.

Se ha descubierto la existencia de distintas formas del intercambiador Na^+/H^+ que presentan pequeñas diferencias entre sí. El primer tipo fue clonado por Sardet y cols. (1989) y se denominó NHE1. Posteriormente se han identificado otros tres tipos denominados NHE2, NHE3 y NHE4 (Tse y cols., 1991; 1993; 1994). Todos ellos son parecidos en su estructura primaria (NHE1, 815-820 a.a.; NHE2, 809-813 a.a.; NHE3, 831-832 a.a.; NHE4, 717 a.a.) y en la estructura secundaria sugerida. Únicamente se diferencian en su presencia o no en los distintos tejidos y especies animales, en su sensibilidad a diferentes inhibidores ensayados (todos ellos derivados del diurético amilorida) y a los estímulos aplicados, y en sus propiedades cinéticas, pudiendo coexistir varias isoformas en una misma célula.

Todos presentan dos dominios estructural y funcionalmente distintos: N-terminal (10-12 α -hélices de membrana) y un largo dominio C-terminal localizado en el citoplasma (Yun y cols., 1995). El significado funcional de la localización de las hélices en el espesor de la membrana no se conoce con exactitud a excepción de la M4, la cual se ha reconocido como el lugar en el que la amilorida y sus derivados se unen para inhibir al intercambiador (Counillon y cols., 1993; Yun y cols., 1993). La principal función del intercambiador es proteger las células de la acidificación del citoplasma. La cinética del intercambiador para el Na^+ extracelular sigue el modelo de Michaelis-Menten, con un coeficiente de Hill de 1, lo que sugiere que hay un único punto de unión para el Na^+ externo (Aronson, 1985).

A pesar de que el Na^+ extracelular sigue una cinética de Michaelis-Menten, los H^+ intracelulares se alejan de este modelo clásico presentando un coeficiente de Hill entre 2 y 3 (Aronson y cols., 1982; Levine y cols., 1993; Orłowski, 1993; Tse y cols., 1993). Los datos disponibles apoyan un modelo alostérico con al menos dos puntos de unión de los H^+ . Se piensa que, además del punto de unión de los H^+ , existe un punto interno modificador en el que la unión de los H^+ regula el funcionamiento del intercambiador. La actividad de este intercambiador, medida como salida de Na^+ y entrada de H^+ es

máxima a pH_i ácido y se reduce cuando el pH_i aumenta por encima de 7.5 (Frelin y cols., 1988).

2.7.2.2.1.1.- Regulación.

La mayoría de los reguladores descritos hasta la fecha estimulan la actividad del intercambiador Na^+/H^+ e inducen una alcalinización del citosol, que puede llegar a incrementar el pH hasta en 0.4 unidades (Frelin y cols., 1988). Su actividad se ve influida por la $[\text{Na}^+]_o$, y el pH_o ; pero también se ha visto que la presencia en el medio extracelular de cationes como Li^{3+} y NH_4^+ reducen su actividad (Aronson, 1985).

Factores de crecimiento: se ha demostrado que la estimulación del intercambiador Na^+/H^+ por factores de crecimiento, que median su acción a través de la vía de las tirosinas cinasas, como el factor de crecimiento epidermal (EGF) y/o el suero fetal bovino (FBS) se produce en parte por fosforilación (Sardet y cols., 1990; 1991). Por ejemplo, el NHE1 es fosforilado únicamente en residuos de serina y no de treonina o tirosina, y todos los factores de crecimiento presentan un patrón de fosforilación común (Sardet y cols., 1989). Así, estos resultados sugieren que las rutas de transducción de señales convergen en una cinasa común que bien podría ser la proteína cinasa activada por factores mitógenos (MAP cinasa) (Sardet y cols., 1990) o bien una cinasa asociada al intercambiador Na^+/H^+ (Sardet y cols., 1991). Se sabe, sin embargo, que el extremo C-terminal localizado en el citoplasma es esencial para su regulación (Wakabayashi y cols., 1992; 1994).

PKC: la activación de la PKC es el proceso responsable de la acción de muchos mitógenos; así se ha podido comprobar que el NHE1 se localiza en los fibroblastos junto con las placas de adhesión que son necesarias para su activación. Esta unión hace que los elementos del citoesqueleto sean candidatos a proteínas accesorias que podrían tener un papel importante en la regulación de la actividad del intercambiador (Swartz y Lechene, 1992).

Activación dependiente de Ca^{2+} : recientemente se ha propuesto que la calmodulina se une a una región del NHE1 de una manera dependiente de Ca^{2+} , de modo que la actividad de este intercambiador se vería aumentada tras una elevación en

la $[Ca^{2+}]_i$ (Frelin y cols., 1988), aunque también podría participar alguna cinasa que fuera dependiente del complejo Ca^{2+} -calmodulina.

Regulación por AMPc: en eritrocitos de trucha las catecolaminas incrementan los niveles citosólicos de AMPc actuando a través de los receptores β -adrenérgicos, e incrementan la actividad del intercambiador Na^+/H^+ . En células renales y en vesícula biliar de *Necturus*, una elevación de los niveles citoplasmáticos de AMPc conduce al efecto opuesto, es decir a una reducción en su actividad (Frelin y cols., 1988).

Hiperosmolaridad: el intercambiador Na^+/H^+ juega un papel importante en el proceso de captura de Na^+ por aquellas células que han sido sometidas a un tratamiento con soluciones hiperosmóticas (“cell shrinkage”) (Grinstein y cols., 1985; 1986; 1992). Fundamentalmente la forma NHE1 es la más afectada por este proceso. Por el contrario, recientemente se ha visto que la hiperosmolaridad reduce la actividad de los tipos NHE2 y NHE3 que eran expresados en la línea celular PS120 de fibroblastos (Yun y cols., 1995). La inhibición del NHE3 también se ha visto en las líneas celulares de tubo proximal de riñón LLC-PK1 y OK (Soleimani y cols., 1994).

Se piensa que el efecto de las soluciones hiperosmóticas se ejerce a través de cambios inducidos en las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular, o en la concentración intracelular de solutos o de macromoléculas (Gardner y Burg, 1994). Para finalizar se tiene la sospecha de que la activación del intercambiador Na^+/H^+ por los tratamientos osmóticos está relacionada con los mecanismos de regulación del volumen celular (Grinstein y cols., 1985; 1986).

Efectos del ATP: una reducción de los niveles de ATP en la célula reduce drásticamente la actividad del intercambiador. Experimentalmente se ha constatado que la reducción del nivel de ATP celular se ve reflejada en una disminución en la V_{max} del intercambiador y en su afinidad por los H^+ en el lado citoplasmático (Levine y cols., 1993; Kapus y cols., 1994). Además los coeficientes de Hill se reducen de 2 a 1, de manera que el perfil de la cinética para los H^+ intracelulares se aproximaba al modelo de Michaelis-Menten (Levine y cols., 1993). Se cree que la disminución en los niveles de ATP altera la conformación del extremo citoplasmático de la molécula del intercambiador, de manera que se reduciría su estado de fosforilación y,

consecuentemente, disminuiría la afinidad por los H^+ en el lado citosólico. Pero también se ha sugerido que se podría producir una perturbación en los fosfolípidos de la membrana o una reorganización de los elementos del citoesqueleto, incluyendo las fibras de F-actina, debido a la disminución del ATP celular (Kapus y cols., 1994).

La implicación del intercambiador Na^+/H^+ en los procesos secretores en el páncreas exocrino ha sido el resultado de diversas investigaciones realizadas sobre esta glándula en diferentes especies (Swanson y Solomon, 1975; Schulz, 1981; Bundgaard y cols., 1981; Kuijpers y cols., 1984). Hellmessen y cols. (1985) en los estudios realizados empleando células acinares pancreáticas de rata describen un intercambiador Na^+/H^+ que está regulado por el pH_i y que presenta un alto grado de dependencia del ion Na^+ . En otra especie como el cobaya, Bastie y cols. (1988) describen la presencia de este intercambiador y aluden a que la PKC podría estar implicada en su activación en respuesta a la estimulación por CCK y gastrina. La existencia del intercambiador Na^+/H^+ también ha sido propuesta en el caso de la línea AR4-2J de células pancreáticas, donde Delvaux y cols. (1990) relacionan la activación de este intercambiador con los procesos de proliferación celular. Así mismo, se le ha implicado como uno de los mecanismos responsables para el transporte de NaCl, recuperación del volumen celular y proliferación en células acinares pancreáticas (Muallem y Loessberg, 1990) y que aumenta su actividad en respuesta a la estimulación por secretagogos.

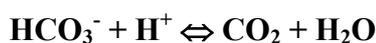
2.7.2.2.2.- Sistemas dependientes de HCO_3^- .

Los estudios encaminados al conocimiento de los mecanismos que regulan el pH en las células animales se han basado en su mayoría en el intercambiador Na^+/H^+ , de manera que los sistemas dependientes de HCO_3^- han recibido menos atención. Las condiciones en las que se realizaron los estudios anteriores se caracterizaban por la ausencia de HCO_3^- en el medio con lo que la influencia de estos sistemas era nula. Sin embargo en presencia de HCO_3^- están activos otros sistemas de regulación del pH_i que lo llevan a un valor estable cuando el intercambiador Na^+/H^+ está inactivo (Frelin y cols., 1988).

La demostración de que en las células existen sistemas de regulación del pH_i que son dependientes de HCO_3^- es fácil. Sin embargo, la identificación del sistema que está

implicado y el análisis de sus propiedades bioquímicas son más difíciles de llevar a cabo. Esto es así porque existe más de un sistema de transporte de HCO_3^- , no existen inhibidores potentes de estos sistemas y el ion HCO_3^- se equilibra con el CO_2 , que es volátil y que modifica el pH_i por sí mismo.

La regulación del pH_i por HCO_3^- requiere la existencia de un sistema de transporte de HCO_3^- en la membrana y también una alta permeabilidad de ésta al CO_2 . Este proceso se ve facilitado por la enzima anhidrasa carbónica que cataliza la reacción



Los sistemas de transporte de HCO_3^- actúan tanto acidificando como alcalinizando el citosol, celular dependiendo del flujo neto de HCO_3^- a través de la membrana. Un flujo neto de HCO_3^- hacia el interior se asocia a una alcalinización, mientras que la acidificación está asociada al proceso contrario.

Los tres principales mecanismos dependientes de HCO_3^- que intervienen en la regulación del pH_i son los que se detallan a continuación:

a) Intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ . Actúa como alcalinizador del medio intracelular. Su presencia es fácil de probar demostrando que es posible la recuperación de una carga ácida del citosol en un medio con Na^+ y HCO_3^- cuando se está empleando un inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ (como por ejemplo la amilorida). Esta recuperación requiere Cl^- , y actúa intercambiando Na^+ y HCO_3^- extracelulares por Cl^- y H^+ intracelulares. Actúa a expensas de la energía proporcionada por el gradiente electroquímico generado por el ion Na^+ a través de la membrana (Roos y Boron, 1981). Su actividad es inhibida por los derivados del estilbena, el 4,4'-diisotiocianoestilbena-2,2'-disulfonato (DIDS) y el 4-acetamido-4'-isotiocianoestilbena-2,2'-disulfonato (SITS). La relación entre la actividad del intercambiador y la concentración de Na^+ en el medio extracelular sigue una cinética de tipo Michaelis-Menten (Roos y Boron, 1981).

Es un sistema de transporte de iones electroneutro, en el que un Na^+ y dos iones HCO_3^- son intercambiados por 1 Cl^- o bien Na^+ y HCO_3^- son intercambiados por H^+ y Cl^- . Así existe un componente de Na^+ que entra en la célula y el sistema es dependiente

tanto del HCO_3^- extracelular como del Cl^- intracelular. La existencia de Na^+ y HCO_3^- promueve una salida de Cl^- en condiciones en que se ha producido una acidificación del medio intracelular.

Juega un papel importante en la regulación del pH en invertebrados como se ha demostrado en experimentos realizados sobre el axón gigante del calamar (Boron y Russel, 1983) y más recientemente en fibroblastos de pulmón de hamster (LAllemain y cols., 1985), células leucémicas humanas y en células Vero (Frelin y cols., 1988).

Este intercambiador aún no se ha podido caracterizar desde el punto de vista molecular.

b) Intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ no dependiente de Na^+ . Cataliza la salida neta de HCO_3^- actuando, por tanto, como un mecanismo acidificador del medio intracelular, ya que participa activamente en los procesos de recuperación de una carga alcalina del citosol (Frelin y cols., 1988). Este sistema de transporte intercambia Cl^- por HCO_3^- con una estequiometría 1:1, con lo que se caracteriza por ser electroneutro, y sigue una cinética de tipo Michaelis-Menten para la concentración de Cl^- extracelular. Cuando se reduce el contenido en Cl^- del medio extracelular este sistema revierte su funcionamiento y actúa entonces como alcalinizador del citoplasma (Frelin y cols., 1988; Muallem y Loessberg, 1990).

Su actividad depende de la presencia de HCO_3^- en el medio, pero es independiente de la presencia de Na^+ , y también es inhibido por los derivados del estilbeno DIDS y SITS. Su funcionamiento también se ve influido por el pH_i , de manera que cuando éste aumenta también aumenta su actividad y alostéricamente (Olsnes y cols., 1986; Fineman y cols., 1990).

Este intercambiador se describió por primera vez en eritrocitos, células en las que es fundamental para el transporte de CO_2 . Su distribución es bastante amplia en los diferentes tipos celulares; en las células epiteliales se ha descrito en la membrana apical y también en la basolateral (Boron, 1986; Ilundáin, 1992; Peral y cols., 1995). En las células acinares pancreáticas también se ha descrito fruto de experimentos en los que se ensayaba la recuperación del pH_i en medios con HCO_3^- pero en ausencia de Na^+ y Cl^-

(Muallem y Loessberg, 1990), aunque ya se había aludido a su existencia con anterioridad en experimentos en los que se ponía de manifiesto su dependencia del pH_i .

Al igual que sucede con el intercambiador Na^+/H^+ , para este otro tipo de intercambiador también se han descrito varias isoformas en función de su homología estructural en células de diferentes especies animales (AE-1, AE-2 y AE-3) (Kopito y Lodish, 1985; Kopito, 1990; Alper, 1991).

Los distintos subtipos descritos son glucoproteínas con un peso molecular aproximado de 100 Kdaltons y 10 a 14 hélices localizadas en el espesor de la membrana celular. Los extremos amino y carboxilo terminal están localizados en el citoplasma (Liebermann y Reithmeier, 1988). El dominio de transmembrana del extremo C-terminal es el lugar donde se ha propuesto que se lleva a cabo el intercambio de iones, mientras que el N-terminal estaría implicado en la regulación del intercambiador (Kopito y cols., 1989; Kopito, 1990).

Se cree que pudiera estar localizado en la membrana basolateral y que podría tener importantes implicaciones en el contenido de ClNa de la secreción fluida elaborada por el páncreas exocrino. Pero hay estudios que no coinciden en sus resultados con los de los autores anteriores y en los que se ha postulado que su localización es la membrana del polo luminal (Muallem y Loessberg, 1990).

c) Cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Este “simporter” se ha identificado en el endotelio de la córnea de bóvidos (Jentsch y cols., 1985) y en la línea celular BSC1 de riñón (Jentsch y cols., 1985; 1986). La dirección del cotransporte está determinada por los gradientes electroquímicos a través de la membrana celular de los iones Na^+ y HCO_3^- y por el potencial eléctrico de la membrana. En las células el sistema actúa para transportar HCO_3^- hacia el interior y por lo tanto es un sistema alcalinizador del citoplasma. Es selectivo para el ion Na^+ , se ha mostrado independiente de Cl^- y es electrogénico (Jentsch y cols., 1986; Frelín y cols., 1988).

Su existencia también se ha descrito en células acinares pancreáticas (Muallem y Loessberg, 1990) así como en otras células del tracto gastrointestinal (Wenzl y cols.,

1989), y se ve inhibido, al igual que los otros sistemas de transporte dependientes de HCO_3^- , por los derivados del estilbeno DIDS y SITS.

La estequiometría del transporte de estos iones podría ser 3 HCO_3^- :1 Na^+ ó al menos 2 HCO_3^- : 1 Na^+ (Wenzl y cols. 1989). Con un potencial de membrana de -50 a -60 mV una estequiometría de 2:1 hablaría en favor de una entrada de HCO_3^- , mientras que la relación 3:1 apoyaría la salida del ion al medio extracelular. Sobre la base de las determinaciones de los movimientos de HCO_3^- y las consideraciones termodinámicas, la principal función del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ en las células acinares pancreáticas es la salida de HCO_3^- (Muallem y Loessberg, 1990).

Es un sistema de transporte de iones que no se afecta por el tratamiento de las células con amilorida (Muallem y Loessberg, 1990) pero se han descrito mecanismos de transporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ tanto dependientes (Roos y Boron, 1981) como independientes de Cl^- (Boron y Boulpaep, 1983; Jetsch y cols., 1985). En las células acinares pancreáticas este cotransportador parece no depender del ion Cl^- para su funcionamiento (Muallem y Loessberg, 1990).

Las funciones del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ incluyen la regulación del pH_i y el transporte de iones a través de la membrana, iones que luego aparecerán en las secreciones elaboradas por las células de estos tejidos.

Al igual que sucedía para el intercambiador Na^+/H^+ , la actividad de los sistemas de regulación del pH_i dependientes del transporte de HCO_3^- está bajo control hormonal. Olsnes y cols.(1986) demostraron que el tratamiento de células Vero y L con ésteres de forbol conducía a la activación del intercambiador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$. En otros estudios se ha visto que agentes que incrementan los niveles citoplasmáticos de AMPc inhiben el intercambiador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (Reus, 1987). Muallem y Loessberg (1990), en estudios en los que evaluaban la recuperación del pH_i en células acinares pancreáticas tras una carga ácida en presencia de amilorida, revelan que la estimulación con CCK-8 inhibe la actividad de este cotransportador en un 41%.

En algunos estudios se ha encontrado una posible regulación combinada de los sistemas de transporte dependientes de HCO_3^- y el intercambiador Na^+/H^+ ; así por

ejemplo en vesícula biliar de *Necturus*, el AMPc induce una inhibición tanto del intercambiador Na^+/H^+ como del $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (Reus, 1987; Frelin y cols., 1988). En células renales de conejo la actividad del intercambiador Na^+/H^+ y del cotransportador $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ varían paralelamente en los procesos de acidosis y alcalosis metabólicas (Akiba y cols., 1987).

2.7.2.2.3.- Bombas de H^+ .

Se ha propuesto que al menos tres bombas de H^+ dependientes de ATP podrían estar implicadas en la regulación del pH_i :

- ATPasa transportadora de H^+ , que se ha encontrado en segmentos distales de nefrona, vejiga de la orina de tortugas y epidermis de rana.
- ATPasa intercambiadora de K^+ y H^+ , de carácter electroneutro y responsable de la secreción de la secreción ácida gástrica.
- ATPasa de H^+ localizada en la membrana de vacuolas endocíticas y secretoras (Frelin y cols., 1988).

La ATPasa vacuolar se localiza en la membrana de los lisosomas, complejo de Golgi, endosomas y en los gránulos de secreción (Bowman y cols., 1988; Pedersen y Carafoli, 1989; Stone y cols., 1989) y se encarga de mantener el pH del espacio interno de estos orgánulos entre 4'5 y 6'5 (Mellman y cols. 1986). En el proceso de exocitosis la membrana de estas vacuolas se fusionan con la membrana celular con lo que puede estar también localizada en este punto y participar en la regulación del pH_i (Cannon y cols., 1985).

Se ha encontrado un tipo de ATPasa de H^+ en la membrana interna de las mitocondrias, cloroplastos y en la membrana plasmática de algunas bacterias. En las mitocondrias y cloroplastos esta bomba participa en los procesos de síntesis de ATP (Skulachev, 1977). También podría ocurrir que este transporte de H^+ estuviera acoplado a un transporte de Ca^{2+} , constituyendo así un intercambiador o una bomba que intercambia estos dos iones. Addanki y cols. (1968) observaron que la adición de 0'5 mM de Ca^{2+} al medio que rodeaba las mitocondrias con que estaban trabajando tenía

como resultado un incremento en el pH dentro de las mitocondrias, indicando una posible extrusión de H^+ . De modo inverso, la inyección de Ca^{2+} en el citoplasma de neuronas de caracoles conducía a una reducción del pH_i (Meech y Thomas, 1977; 1980), lo que explicaron basándose en la existencia de un transporte de Ca^{2+} hacia el interior de las mitocondrias en intercambio por H^+ .

En la membrana de los tilacoides de los cloroplastos también se ha propuesto la existencia de esta bomba de H^+ (Mitchel, 1976). El gradiente de H^+ generado podría ser utilizado como fuente de energía para la síntesis de ATP (Jagendorf y Uribe, 1966).

La ATPasa que intercambia H^+ y K^+ se localizó inicialmente en la membrana apical de las células parietales del estómago (Ganser y Forte, 1973; Sachs y cols., 1976) y es la responsable de la aparición de ácido en el jugo gástrico.

Estos tipos de ATPasas de H^+ se pueden diferenciar por su perfil farmacológico, siendo inhibidas por DCCD, NEM y rotenona. El empleo de la bafilomicina A1 ayuda a distinguir los tres tipos porque inhibe fuertemente a la ATPasa vacuolar (Gretchen y cols., 1994). La ATPasa H^+/K^+ es inhibida por SCH 28080 (Abrahamse y cols., 1994), por omeprazol (Lorentzon y cols., 1985) y vanadato (Planelles y cols., 1991).

Debido al funcionamiento de estas bombas de H^+ , existe una compartimentalización del pH en el interior de los orgánulos citoplasmáticos, lo que ha podido ser determinado mediante el empleo de la base débil DAMP (Orci y cols., 1987) que se reparte dentro de los compartimentos celulares en función del pH existente en su interior. De esta manera se sabe que dentro del complejo de Golgi el pH es de 7'0, en las vacuolas de condensación de 5'6, en las gránulos de zimógeno de 6'5 y en los lisosomas de 5'3.

Existen otros posibles mecanismos de transporte de iones que podrían estar implicados en la regulación del pH_i . Recientemente se ha descrito un intercambio K^+/H^+ en el borde en cepillo de vesículas aisladas de células intestinales de pollo (Peral y cols., 1995). En vesículas procedentes del borde en cepillo de células renales se ha en propuesto la presencia de una conductancia para H^+ (Frelin y cols., 1988) así como en eritrocitos de pollo (Peral y cols., 1995). Sin embargo la existencia de canales para H^+

parece no ser muy importante para el mantenimiento del pH_i . Esto es debido a que en condiciones fisiológicas, o tras el bloqueo de los principales sistemas de mantenimiento del pH_i , éste presenta un valor por encima del gradiente electroquímico y es relativamente insensible a cambios en el potencial de membrana. De ahí que su significado fisiológico no esté aun muy claro.

Hasta la fecha en el páncreas exocrino se ha propuesto la existencia del intercambiador Na^+/H^+ , intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ no dependiente de Na^+ y del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ no dependiente de Cl^- (Muallem y Loessberg, 1990). El intercambiador Na^+/H^+ retira ácido del citoplasma, mientras que el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ retiran álcalis para mantener el pH_i estable entorno a $7.1-7.2$ aproximadamente (Muallem y Loessberg, 1990).

2.7.3.- El ion H^+ como mensajero intracelular.

La posibilidad de que las variaciones en el pH_i funcionen como un mecanismo de señalización intracelular en las respuestas celulares a los estímulos fisiológicos, ha sido objeto de atención en algunos estudios. El hecho de que las células regulen su pH_i de una manera muy precisa y que puedan, una vez activadas, cambiar el valor de pH_i , sugiere que estos cambios podrían representar una señal en respuesta a mensajeros extracelulares. El interés sobre la hipótesis del pH_i como factor implicado en la señalización intracelular tras la activación de los receptores celulares surgió tras la observación de que se producen cambios en este parámetro acompañando a la acción de hormonas y factores de crecimiento que median su acción a través de la hidrólisis de los fosfolípidos de inositol (L'Allemain y cols., 1984b). La estimulación de acinos pancreáticos de rata con CCK-8 se acompaña de una acidificación inicial que es independiente de cualquier mecanismo que transporte ácido y/o base que esté localizado en la membrana plasmática (Muallem y Loessberg, 1990); en fibroblastos, Ives y Daniel (1987) describen una acidificación del citoplasma de estas células cuando se les estimula con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), bombesina y bradicinina, y que estas respuestas no se veían afectadas por la presencia de amilorida, aunque ellos finalmente relacionan estos cambios en el pH_i con los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producidos en respuesta a estos agentes.

Por el contrario, en otros casos, se ha sugerido que los cambios observados en el pH_i no son esenciales en la señalización de los procesos desencadenados por la acción de los mensajeros extracelulares cuando actúan sobre sus receptores. Si esto fuera así, implicaría que algunas funciones celulares se pusieran en marcha por un cambio en el pH_i y que deberían ser altamente sensibles a estos cambios de pH_i (Frelin y cols., 1988). Se sabe que hay funciones celulares que dependen de una manera crucial en el pH_i : la fosfofructocinasa de la vía de la glucólisis, la proteína cinasa ribosomal S6, canales para Na^+ y K^+ en riñón; un cambio provocado en el pH_i ha revelado que modifica la endocitosis de transferrina y de factores de crecimiento en varios tipos de células (Frelin y cols., 1988).

Pero podría ser que el incremento en la actividad de los diversos sistemas de intercambio de iones en respuesta a los mensajeros representase unicamente un mecanismo que contrarrestara la acidificación citoplasmática originada por el incremento de la actividad metabólica o bien para la regulación del volumen celular que se modifica tras los procesos de exocitosis (Frelin y cols., 1988).

El efecto contrario también se ha observado, es decir una alcalinización es también posible tras la activación de la célula. Los factores de crecimiento y los mitógenos como los ésteres de forbol estimulan la división celular, asociada a la cual existe un incremento en el pH_i que podría ser el estímulo clave para esta activación. En diversos estudios se ha señalado al intercambiador Na^+/H^+ como responsable de esta alcalinización: Ives y Daniel (1987) en fibroblastos; Haimovici y cols. (1994) en hepatocitos, o Yun y cols. en su revisión de 1995 sobre los distintos tipos de intercambiadores Na^+/H^+ existentes en las células de mamíferos. Pero aun así no está muy claro si este incremento en el pH_i resultante es necesario para desencadenar el crecimiento celular (Johnson y cols., 1976; Thomas, 1986), puesto que en presencia de HCO_3^- no se producen incrementos en el pH_i , aun cuando se mantiene el efecto proliferativo de los mitógenos (Grinstein y cols., 1989).

2.7.4.- Regulación del volumen celular.

La célula puede emplear varios mecanismos para la regulación de su volumen (Lang y Häusinger, 1993), y la forma más eficiente es mediante el movimiento de iones

a través de su membrana; así se “ganan” o “pierden” solutos osmóticamente activos. Los procesos de regulación del volumen celular por medio de pérdida o ganancia de solutos se ha denominado disminución reguladora del volumen celular (RVD) y aumento regulador del volumen celular (RVI).

El aumento del volumen celular como consecuencia de la entrada de agua en el citosol se ha denominado con el término inglés “swelling”; el proceso contrario, disminución del volumen celular recibe el nombre de “shrinkage”.

Debido a que las hormonas y neurotransmisores que desencadenan una respuesta también van a modificar el volumen celular, junto con el hecho de que hay determinados procesos metabólicos que son sensibles a los cambios de volumen celular, como la proteólisis y la glucogenólisis, se ha empezado a barajar la hipótesis de que las alteraciones del volumen celular podrían ser consideradas como un nuevo segundo mensajero en la transducción de señales (Lang y cols., 1995). Incluso en estudios recientes se ha puesto de manifiesto que las células, de alguna manera, pueden determinar cómo se ha llevado a cabo un cambio de volumen concreto (Motais y cols., 1991); más aún que las células pueden detectar el alcance del cambio de volumen que están experimentando (Lohr y Granthman, 1986) de manera que serían capaces de detectar y responder a cambios de volumen o de la composición del medio intracelular inferiores a un 3%.

Cuando las células han sufrido “swelling”, lo que ocurriría si se someten a soluciones hiposmóticas con respecto al medio intracelular, la mayoría de ellas liberan K^+ y Cl^- a través de los canales correspondientes, que podrían ser tanto específicos para estos iones como inespecíficos, permitiendo en este último caso la salida de HCO_3^- o incluso a.a. También se eliminan iones a través del cotransporte de ClK , de los intercambiadores K^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- , así como a través de una $ATPasa Na^+/Ca^{2+}$ (pierden ClK y Na^+). Para completar este proceso también se pueden perder solutos orgánicos que en un principio salen de la célula por flujo pasivo a través de la membrana pero también existe pérdida de solutos orgánicos por medio de mecanismos de transporte que parecen no ser específicos (Jackson y Strange, 1993).

Si la célula ha sufrido “shrinkage”, va a acumular iones a través del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, o los intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (ganando ClNa). La activación de la ATPasa Na^+/K^+ reemplaza el Na^+ por K^+ . Se pueden también acumular solutos orgánicos mediante la producción de cambios en la actividad de determinados transportadores o bien en su síntesis o degradación. Este es un proceso lento y en ocasiones requiere horas para completarse tras su activación.

2.7.5.- Calcio intracelular y pH_i .

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

Meech y Thomas (1977; 1980) realizaron experimentos en los que encontraron que tras la inyección de Ca^{2+} en neuronas se producía una caída en el pH_i , lo cual era seguido de una posterior recuperación. Además se produce una hiperpolarización debido al aumento de la permeabilidad al ion K^+ (Meech, 1972; Krnjevic y Lisiewicz, 1972). Ellos explicaron este fenómeno por la posible existencia de un intercambio de Ca^{2+} por H^+ en las mitocondrias, como también habían descrito anteriormente otros autores en sus trabajos con mitocondrias aisladas (Bartley y Amoore, 1958; Chance, 1965). Se obtuvieron resultados en favor de esta hipótesis cuando se emplearon inhibidores mitocondriales como el rojo de rutenio (Vasington y cols., 1972).

El efecto contrario también se ha observado; una acidificación del citoplasma, producida por ejemplo mediante inyección de H^+ , conduce a un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ posiblemente por producirse un intercambio del Ca^{2+} por los H^+ existentes en la mitocondria u otro orgánulo citoplasmático (Rose y Rick, 1978; Rink y cols., 1980).

Roos y Boron (1981) concluyen que la caída en el pH_i :

- podría inhibir la entrada de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares,
- podría conducir a la liberación de Ca^{2+} desde estos depósitos,
- podría desplazar el Ca^{2+} desde algún orgánulo intracelular o desde una proteína ligadora de Ca^{2+} .

Así, por ejemplo, en células musculares una reducción en el pH_i facilita la salida de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS). En el acoplamiento estímulo-secreción la administración de gastrina y trombina conduce a la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares en células parietales y plaquetas (Tsunoda y cols., 1993), proceso asociado a una acidificación del citosol. También en neutrófilos, plaquetas y células parietales la administración de nigericina, ionóforo que disipa el potencial de membrana e incrementa el intercambio K^+/H^+ , conduce a una disminución del pH_i por anulación del gradiente de K^+ y la producción de un cambio compensador en las concentraciones de K^+ y de H^+ . Esta reducción en el pH_i lleva asociada un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Tsunoda y cols., 1993).

En otros estudios se observó que la acidificación citoplasmática inducida por la supresión del ion Na^+ en el medio extracelular, la cual se debía a que el intercambiador Na^+/H^+ funcionaba extrayendo Na^+ de la célula e introduciendo H^+ , tenía como resultado un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Roos y Boron, 1981). Un efecto similar del Na^+ se ha observado en fibroblastos donde una baja $[\text{Na}^+]_o$ conduce a la movilización de Ca^{2+} desde los depósitos y además existe una activación del metabolismo de los fosfolípidos de inositol. Apoyando el efecto de la sustitución del Na^+ en el medio en el que se encuentran las células están los resultados obtenidos en experimentos realizados con células de músculo liso de aorta en los que la sustitución del ion Na^+ por manitol conducía a un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Tsunoda, 1993).

En estos mismos estudios se ha descrito que la acidificación del citoplasma por otros medios como el tratamiento con ácido propiónico, que reduce el pH_i , promueve la movilización de Ca^{2+} en neutrófilos.

De esta forma, la acidificación del citosol podría funcionar como una fuerza que dirige los H^+ hacia los depósitos intracelulares, con un transporte de iones Ca^{2+} en sentido opuesto por medio de un sistema que podría ser un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ o canales de Ca^{2+} sensibles a H^+ . Tsunoda (1990) encontró que las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas son sensibles a los cambios de pH_i ; una acidificación del medio intracelular mediante el empleo de la técnica del pulso de NH_4Cl hacía que aumentara transitoriamente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células que presentaban una respuesta oscilatoria a 20 pM de CCK, y se eliminaba el patrón oscilatorio. Una nueva aplicación

de NH_4Cl hacía que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se redujera hasta el valor basal, proceso que explicó en términos de un transporte de Ca^{2+} hacia los depósitos. Cuando empleó ácido propiónico la acidificación del citoplasma no originaba cambios en el patrón oscilatorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ante la estimulación con CCK, pero la alcalinización que se producía cuando era retirado el ácido propiónico tenía como resultado una reducción en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e inhibía las oscilaciones.

Estos resultados, junto con los obtenidos en los experimentos realizados también en células acinares pancreáticas por Muallem y Loessberg (1990), en los que agonistas que median su acción a través de la vía del Ca^{2+} intracelular provocaban cambios en el pH_i por actuación sobre los mecanismos de transporte de iones, han llevado a pensar que la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos y la recarga de los mismos podría requerir un flujo compensador de H^+ en la dirección opuesta al movimiento de Ca^{2+} para mantener la electroneutralidad (Schulz, 1989).

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

De igual manera que la acidificación promueve la activación de un posible intercambiador localizado en la membrana de algún depósito intracelular, pudiera ocurrir que existan canales de Ca^{2+} en la membrana cuya actividad fuera sensible al pH_i . En células LLC-PK1 el tratamiento con nigericina conduce a un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Tsunoda, 1993); este efecto se ve inhibido por verapamil, sugiriendo que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ procede de un aumento en la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana celular. En las células acinares pancreáticas la alcalinización del medio extracelular hace que la entrada de Ca^{2+} en la célula en respuesta a los agonistas se incremente, y esta entrada es inhibida por cationes como La^{3+} y Ni^{2+} . Por el contrario, una reducción en el pH_o conduce a una menor entrada de Ca^{2+} en estas mismas células (Muallem y cols., 1989; Tsunoda y cols., 1990). Por tanto, en el acoplamiento estímulo-secreción la

apertura de canales para Ca^{2+} en la membrana celular parece estar regulada por H^+ que actúan en la cara exterior de la misma.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, sería posible que aquellas variaciones que se producen en el pH_i o en el pH del interior de los depósitos de Ca^{2+} cuando las células han sido estimuladas por agonistas podrían tener alguna influencia sobre la cinética de los canales de Ca^{2+} que pudieran existir en sus membranas. En el RE de las células acinares pancreáticas y de glándula parótida se ha propuesto la existencia de un canal de Ca^{2+} sensible a pH (Schulz y cols., 1987). Cuando el pH del interior del retículo está por debajo del valor de reposo el canal está cerrado, mientras que si el pH aumenta el canal se abre y permite la salida de Ca^{2+} . En un estudio posterior Schulz y cols. (1989) proponen la existencia de canales de Ca^{2+} , presentes en el depósito insensible a IP_3 , que podrían ser sensibles a una alcalinización en la proximidad regional de la membrana de este depósito. Esta alcalinización sería el resultado de la actuación de una bomba de H^+ localizada en la membrana del depósito de Ca^{2+} sensible a IP_3 y que crea un gradiente de H^+ a través de la membrana de este depósito de manera que un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, también situado en la membrana de este depósito, se encargaría de la recarga del mismo. Los resultados obtenidos por otros investigadores, Levy y cols. en 1990 y Brosman y Sanders en 1990 (para mayor información consultar Tsunoda, 1993) también apoyan la hipótesis de que el mecanismo de acumulación de Ca^{2+} dentro de sus depósitos intracelulares podría ser un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$.

A pesar de que existen bastantes datos que indican que una acidificación del citosol conduce a un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el efecto contrario también se ha podido observar en muchos tipos celulares. La alcalinización del citosol de células endoteliales de bovino promueve una liberación de Ca^{2+} desde los depósitos accesibles a los agonistas. Este efecto también se ha observado en fibroblastos de aves, linfocitos en respuesta al tratamiento con monensina o NH_3 o en la línea celular AJr5 de músculo liso (Tsunoda, 1993).

Aparte de la movilización de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, una alcalinización por la técnica del pulso de NH_4Cl conduce a un aumento en la entrada de Ca^{2+} en células cocleares, al igual que en plaquetas, donde el tratamiento con trombina

activa el intercambiador Na^+/H^+ alcalinizando el citosol y facilitando la movilización de Ca^{2+} .

2.7.6.- Magnesio intracelular y pH_i .

Los efectos del pH_i sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son complejos y se tienen bastantes resultados que apoyan la hipótesis de que las variaciones que se producen en ambos en respuesta a los secretagogos podrían estar relacionadas. Sin embargo los efectos que los cambios en el pH_i presentan sobre la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ no están muy claros. Tampoco si las variaciones en la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ podrían tener implicaciones sobre el pH_i .

Meech y Thomas (1977) trabajando sobre neuronas de caracol observaron que tras la inyección de Mg^{2+} en estas células no se observaban cambios en el pH_i ni en el potencial de membrana como se había observado para el caso del ion Ca^{2+} . Freundrich y cols. (1992) trabajando con cultivos de células cardíacas de pollo llegaron a la conclusión de que la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ podría aumentar con la acidificación del citoplasma y disminuir en caso de una alcalinización.

Sin embargo en estudios posteriores Quamme (1993) encuentra en cultivos de células epiteliales que ni la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ ni tampoco la distribución espacial de este ion se veían afectados ante procesos de acidificación y/o alcalinización del medio intracelular. Concluye con estos experimentos que la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ no es alterada ante cambios en el pH_i y sugiere que la homeostasis de este ion se regula o mantiene por medio de mecanismos no relacionados con el pH_i , al menos en las células epiteliales (líneas Caco-2 y OK) en que ellos realizaron los experimentos.

Los resultados de que se dispone actualmente son controvertidos y queda bastante trabajo por hacer para clarificar si el patrón de relación $\text{Ca}^{2+}/\text{pH}_i$ también existe para el caso del ion Mg^{2+} .

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Lista de reactivos.

- ACh: cloruro de acetilcolina SIGMA[®].
- CCK-8: [Tyr(SO₃H)₂₇]-colecistokinina fragmento 26-33 SIGMA[®].
- Histamina: dihidrocloridrato de histamina SIGMA[®].
- Dimaprit: dimaprit dihidrocloridrato BEECHAM PHARMACEUTICALS[®].
- α -metilhistamina: histamina,R(-)- α -metil, 2 HCL RBI[®].
- 2-PEA: 2-piridiletilamina SMITH KLINE & FRENCH LABORATORIES Ltd.[®]
- TPA: 13,acetato de 12,O-tetradecanoil forbol SIGMA[®].
- Ionomicina: de Streptomyces conglobatus sal de calcio SIGMA[®].
- Acido ciclopiazónico: de Penicillium cyclopium SIGMA[®].
- Tapsigargina: tapsigargina SIGMA[®].
- Chelerritrina: cloruro de chelerritrina SIGMA[®].
- GFX: GF109203X BIOMOL[®].
- NMDG: N-metil-D-glucamina SIGMA[®].
- Propionato sódico: ácido propiónico, sal sódica SIGMA[®].
- NH₄Cl: cloruro de amonio SIGMA[®].
- HEPES: (ácido N-[Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico]) SIGMA[®].
- BSA: albúmina sérica bovina SIGMA[®].

- Colagenasa tipo III: colagenasa de Clostridium hystolicum Tipo III, fracción A
- SIGMA[®].
- Colagenasa CLSPA: WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION[®].
- Fura-2/AM: fura-2 acetoximetil éster (cell permeant) MOLECULAR PROBES
- Inc.[®], SIGMA[®].
- Fura-2: sal pentapotasio MOLECULAR PROBES Inc.[®], SIGMA[®].
- Magfura-2/AM: mag-fura-2 acetoximetil éster MOLECULAR PROBES Inc.[®]
- Mag-fura-2: sal tetrapotasio MOLECULAR PROBES Inc.[®]
- BCECF: acetoximetil éster de 2'-7'-bis-(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceina
- SIGMA[®].
- Nigericina: antibiotico K178, sal sódica SIGMA[®].
- Kit de Calibración de Calcio II MOLECULAR PROBES Inc.[®]
- Acido plurónico: ácido plurónico F127 MOLECULAR PROBES Inc.[®]
- DMSO: dimetilsulfóxido MERK-SCHUCHARDT[®].
- Digitonina: SIGMA[®].
- Piruvato sódico: ácido pirúvico sal sódica FLUKA[®].
- Glutamato sódico: ácido L-glutámico sal monosódica FLUKA[®].

- Fumarato sódico: ácido fumárico disódico sal anhidra FLUKA[®].
- BME a.a.: solución de aminoácidos 50x SIGMA[®].
- BME vitaminas: solución de vitaminas SIGMA[®].
- Glutamina: L-glutamina SIGMA[®].
- EGTA: ácido etilenglicol-bis(β -aminoetiléter)N,N,N',N'-tetraacético SIGMA[®].
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético SIGMA[®].

Los demás reactivos utilizados rutinariamente en el laboratorio para la preparación de soluciones fisiológicas o reactivos han sido de grado analítico. En todas las soluciones el agua empleada es de calidad milli-Q.

3.2.- Animales de estudio.

Para la realización de los experimentos que permitieron obtener los resultados con los que ha sido posible elaborar esta Tesis Doctoral se emplearon ratas adultas de la cepa *Wistar*, de ambos sexos y de pesos comprendidos entre 200 y 400 gramos.

Los animales se sacrificaban mediante dislocación cervical; seguidamente se practicaba una laparotomía ventral media, o lateral izquierda en otras ocasiones, y se extraía el páncreas lo más rápidamente posible. A continuación se retiraba el bazo, nódulos linfáticos y tejido conectivo y graso que habían sido extraídos junto con el órgano. Todas estas manipulaciones se realizaban en solución salina fisiológica de composición adecuada para cada protocolo experimental.

3.3.- Experimentos con suspensiones acinares.

3.3.1.- Aislamiento de las células acinares pancreáticas.

La técnica empleada para la preparación de los acinos pancreáticos deriva de la desarrollada por Amsterdam y Jamieson en 1972 y modificada posteriormente por Streb y Schulz en 1983 con ligeras modificaciones (Francis y col., 1990).

La solución fisiológica empleada era un Krebs Ringer Hepes (KRH) que tenía la composición que se describe en la tabla I.

Reactivo	P molec.	mM
NaCl	58,44	130
KCl	74,55	5
HEPES	238,3	20
MgSO ₄	246,47	1
CaCl ₂	147,0	1
KH ₂ PO ₄	136,09	1,2
D-glucosa	180,16	10
M. Es. Aa.		1 ml/L
Inh. Trips.		0,1 mg/ml

Tabla I. Composición del medio Krebs Ringer Hepes (KRH) empleado para el aislamiento de los acinos pancreáticos.

El pH de la solución se ajustó a 7'3-7'4 con NaOH 10 N y se hicieron tres particiones del volumen total, añadiendo a cada una cantidades de albúmina sérica bovina (BSA) para alcanzar concentraciones finales de 0'2%, 0'5% y 4% (p/v).

El procedimiento utilizado para la obtención de las células acinares pancreáticas se describe a continuación:

Los páncreas procedentes de dos ratas se lavaban con KRH 0'2% (p/v) BSA y se cortaban en pequeños fragmentos durante 15 minutos hasta que ofrecieran el aspecto de una papilla. A continuación se introducía el macerado en un matraz Erlenmeyer de

plástico (capacidad total de 25 ml) y se incubaba en este mismo KRH en presencia de colagenasa tipo III de SIGMA® (100 unidades/ml, 5 ml por páncreas), durante 15 minutos, gasificando en todo momento con O₂ 100% saturado en agua. Este primer período de incubación se realizaba en un baño termostatzado a 37°C y en agitación continua (100 ciclos/min).

El KRH que contenía la colagenasa se retiraba por aspiración dejando que el tejido, parcialmente digerido, se depositara en el fondo del matraz. Se añadían 20 ml de KRH 0'2% (p/v) BSA libre de calcio (Ca²⁺) y magnesio (Mg²⁺) y conteniendo 1 mM de EDTA, para posteriormente incubar el contenido bajo las mismas condiciones descritas anteriormente durante 5 minutos. Terminada esta incubación en medio libre de Ca²⁺ y Mg²⁺, el buffer era retirado nuevamente y el tejido lavado 3 veces con KRH 0'2% (p/v) BSA (3x10 ml), retirábamos el sobrenadante y añadíamos 10 ml de este mismo KRH (0'2% (p/v) BSA) conteniendo 150 unidades de colagenasa por ml (5 ml por cada páncreas); seguidamente se sometían a una nueva incubación de 60 minutos de duración a 37°C, aireación (O₂ 100% saturado en agua) y agitación constante (100 ciclos/min) para una completa digestión del tejido.

El contenido del matraz se depositaba después en un tubo de plástico (50 ml de capacidad) y centrifugado (50 g) durante 4 minutos a 4°C. Retirábamos el sobrenadante y el sedimento o precipitado era resuspendido en 30 ml de KRH 0'2% (p/v) BSA. Seguidamente practicábamos una disgregación mecánica de los acinos haciéndolos pasar a través de puntas de pipeta flameadas y de diámetros decrecientes (3-1 mm). Esta labor se realizaba a 4°C, empleando en ella un tiempo aproximado de 30 minutos e igual para todas las preparaciones. Concluída esta dispersión mecánica se filtraba la suspensión acinar a través de una gasa doble y se procedía a una nueva centrifugación (50 g durante 4 minutos y 4°C), tras la cual los acinos se resuspendían en KRH que contenía un 4% (p/v) de BSA, proceso dirigido a retirar fragmentos celulares y para detener la acción de posibles restos de colagenasa; de nuevo eran centrifugados (50 g durante 4 minutos y 4°C) los acinos para a continuación resuspenderlos en KRH 0'5% (p/v) de BSA, solución en la que se centrifugaban y resuspendían dos veces más.

Con este procedimiento se obtenían agrupaciones que variaban entre las 3 y las 12 células por acino. Las células se mantenían sobre hielo hasta su utilización, conservando su viabilidad en un 95% ó más, como indicaba la extrusión de azul trypan.

3.3.2.- Determinación de la concentración de calcio intracelular.

3.3.2.1.- Introducción.

En las células exocrinas de tracto gastrointestinal, al igual que en la mayoría de los tipos celulares, los iones calcio (Ca^{2+}) desempeñan un papel destacado en los fenómenos de acoplamiento estímulo-secreción. Así la activación de los receptores celulares de una amplia variedad de hormonas y neurotransmisores conduce a un incremento en la concentración de calcio libre citoplasmático ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Muallem y col., 1984; Merrit y Rink, 1987). Este aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se produce debido a su liberación desde los depósitos intracelulares y también a su entrada procedente del medio extracelular (Korchac y col., 1984; Pandol y col., 1985).

En las células acinares pancreáticas se ha determinado que el incremento inicial observado en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, al igual que en otros tipos celulares, se debe en su mayor parte a su liberación desde los depósitos intracelulares (Pandol y col., 1987; Bruzzone, 1986).

En los acontecimientos bioquímicos que conducen a este incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se piensa que está involucrada la estimulación de la enzima fosfolipasa C (PLC), que posteriormente hidroliza fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) para liberar inositol trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DG) (Berridge, 1987). El IP_3 actuará para liberar Ca^{2+} desde un depósito intracelular no mitocondrial (Muallem y col., 1985; Joseph y Williamson, 1986). Esta señal de Ca^{2+} pone en marcha la secreción fluída y de electrolitos merced a la activación de conductancias iónicas en la membrana celular (Nauntofte, 1992; Petersen 1992), así como la liberación de enzimas digestivas (Nathanson y col., 1992; Maruyama y col., 1993).

3.3.2.2.- Carga con el indicador.

Una vez obtenida la suspensión de células acinares realizábamos una partición del volumen total, destinando una parte para la determinación de la autofluorescencia,

células que no se incubaban en presencia del indicador, y el resto se incubaban a temperatura ambiente (20-23°C) en KRH 0'5% (p/v) BSA con una concentración 4 µM de fura-2/AM y ácido plurónico (concentración final no superior al 0'025% v/v) durante 40 minutos en agitación (100 ciclos/min) y constante aireación con O₂ 100% saturado en agua. Concluida esta primera incubación se practicaba una centrifugación suave (50 g) a 4°C durante 4 minutos, se decantaba el sobrenadante y se resuspendía el sedimento en KRH que no contenía BSA. Seguidamente se incubaban nuevamente, esta vez a 37°C con oxigenación y en un baño con agitación (100 ciclos/min), durante 30 minutos. Esta etapa estaba dirigida a dar tiempo para que se produjera la completa deesterificación del indicador a cargo de las esterasas citosólicas, y se le conoce con el nombre de “cleaving”.

Al término de esta última incubación se centrifugaba la suspensión de células (50 g a 4°C durante 4 minutos) y tras decantar el sobrenadante se resuspendía el sedimento en KRH 0% BSA. Esta suspensión final de células acinares pancreáticas se mantenía sobre hielo hasta su utilización.

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

Este procedimiento, que tras múltiples ensayos resultó ser el más eficaz para nuestros objetivos, podemos considerarlo como una modificación del de Streb y Schulz (1983).

3.3.2.3.- Cuantificación de la fluorescencia y $[Ca^{2+}]_i$.

Para la cuantificación de la fluorescencia, se introducían alícuotas de 2 mililitros de la suspensión acinar en una cubeta de cuarzo dentro de un espectrofluorímetro modelo RF-5001PC de Shimadzu. El sistema consta de un dispositivo de microagitación que permitía mantener las células en suspensión y al mismo tiempo eran atemperadas a 37°C, mediante un sistema vehiculador de agua a temperatura constante.

Inicialmente realizamos barridos tanto, de excitación (300-400 nm) como de emisión (450-550 nm), para encontrar las longitudes de onda con las que se obtenían la

excitación máxima y el punto isobéptico de la molécula de fura-2, así como el valor de máxima emisión. Como resultado encontramos que los picos de máxima y mínima fluorescencia se hallaban en valores en torno a 340 y 380 nm respectivamente, y la emisión máxima se registró a 505 nm.

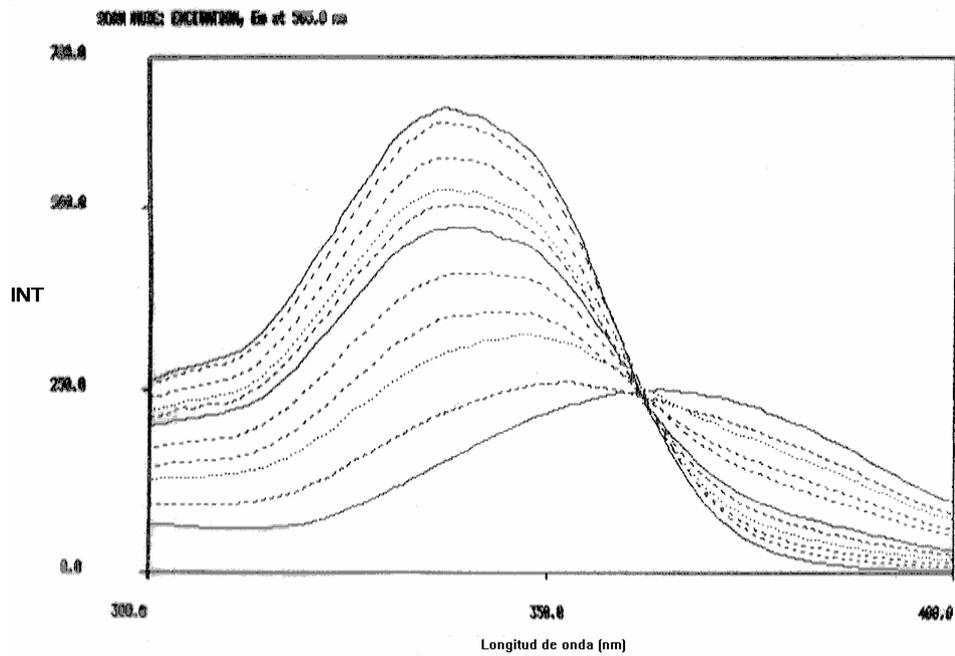


Figura 1. Cambios en la fluorescencia emitida por fura-2 ($2.5 \mu\text{M}$) tras la realización de barridos (300-400 nm, emisión a 505 nm) de soluciones conteniendo diferentes concentraciones de Ca^{2+} (Kit de Calibración de Calcio, Molecular Probes Inc.[®]).

Por consiguiente, las suspensiones celulares serían excitadas alternativamente a 340/380 nm (con un slit de 3 nm) y la fluorescencia emitida registrada a 505 nm (slit de 3 nm).

Para la cuantificación de los valores de la $[Ca^{2+}]_i$ era necesario someter a los valores de fluorescencia que nos suministraba el sistema de detección a una transformación. El primer paso fue la realización de una calibración de nuestro sistema empleando para ello un kit de soluciones con diferentes concentraciones de Ca^{2+} (Molecular Probes Inc.[®]). Así, fuimos capaces de determinar la constante de disociación del indicador fura-2 para el ion Ca^{2+} (Kd) en nuestras condiciones experimentales. La Kd de un indicador se define como el punto de saturación de su molécula al 50%, y se expresa como una concentración (nM). Usando la fluorescencia emitida por el indicador en presencia de las diferentes $[Ca^{2+}]$ que presentan las soluciones de este kit podemos calcular el valor de esta constante. Así pues, alícuotas de 2 ml de cada una de las soluciones en presencia de $2.5 \mu M$ de la sal pentapotasio de fura-2 se introducían en la cubeta del espectrofluorímetro y se realizaban barridos de excitación entre 300 y 400 nm y la fluorescencia emitida era medida a 505 nm; en la figura 1 están representados los cambios en la fluorescencia emitida por las muestras tras la realización de los barridos.

Representando los cambios en la fluorescencia emitida por las muestras frente a la $[Ca^{2+}]$ tenemos una representación lineal (figura 2) en la que el valor que adquiere la variable X cuando Y es igual a 0 nos da el logaritmo decimal de la Kd del fura-2 para el ion Ca^{2+} . De esta manera obtuvimos un valor para la Kd de 219 nM, valor que sería empleado en lo sucesivo para la realización de los cálculos pertinentes. La temperatura a la que se realizaron las determinaciones era de $37^\circ C$.

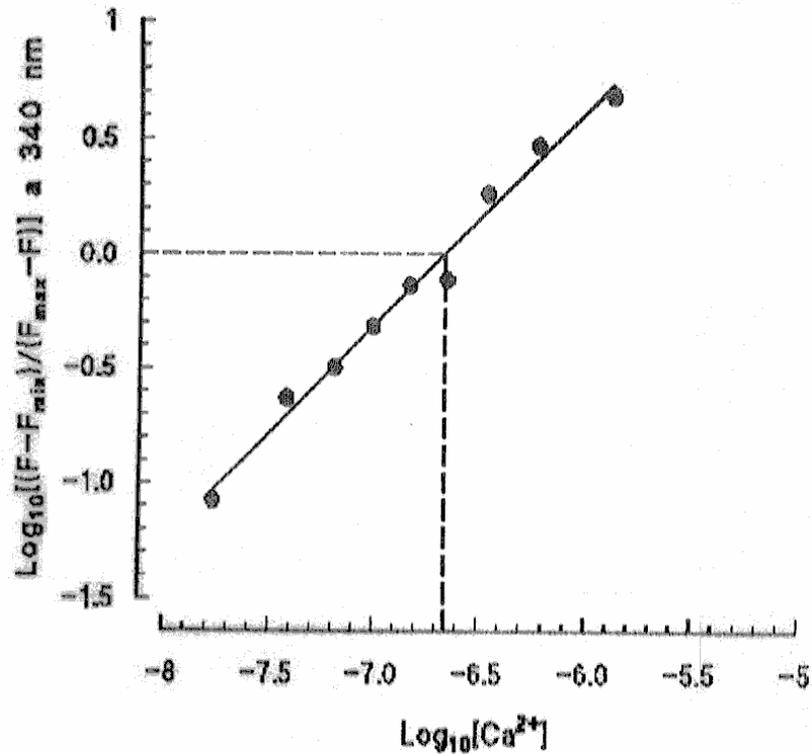


Figura 2. Representación gráfica de los cambios en la fluorescencia emitida por fura-2 (eje de ordenadas) frente a las concentraciones de Ca^{2+} de las soluciones empleadas (eje de abscisas). Los valores han sido transformados y expresados en log_{10} . El valor que adquiere la variable X cuando Y vale 0 corresponde a la K_d del fura-2 para el ion Ca^{2+} .

Para la monitorización de los cambios en la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) las suspensiones celulares eran excitadas alternativamente a 340 y 380 nm, registrando la fluorescencia emitida a 505 nm. Todos los agentes ensayados se añadían directamente en la cubeta a la concentración deseada.

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se calculaba a partir del “ratio” de la fluorescencia emitida a las dos longitudes de onda de excitación (340/380), previa substracción de los valores de autofluorescencia, como se ha descrito previamente (Grynkiewicz y col., 1985).

Para la determinación de los valores de autofluorescencia se tomaban dos mililitros de una suspensión de células acinares que no habían sido incubadas con el indicador y, como si se tratase de un experimento normal, eran excitadas alternativamente a 340 y 380 nm registrando la emisión a 505 nm. Con ello obteníamos dos valores, uno para cada longitud de onda de excitación, que luego serían utilizados en los cálculos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En ningún caso los valores de autofluorescencia superaban en valor el 10% de la fluorescencia emitida cuando el fura-2 estaba presente.

Al término de cada experimento, una vez que la señal emitida alcanzaba un valor estable realizábamos una calibración que consistía en la adición de digitonina (solución stock 5 mM) alcanzando una concentración final en la cubeta de 100 μM para permeabilizar las células y obtener así un valor de fluorescencia máxima (R_{max}) al saturar la molécula de fura-2 con exceso de Ca^{2+} extracelular (que tenía acceso al citosol celular). Cuando la señal de fluorescencia era estable añadíamos Tritón X-100 (concentración final 1% v/v) para disolver todas las membranas celulares y liberar así el indicador que podría haber quedado atrapado dentro de los orgánulos intracelulares (compartimentalización). Las señales obtenidas demostraron una compartimentalización mínima con el método empleado. Alcanzado un nuevo valor estable de fluorescencia añadíamos EGTA (solución stock 500 mM TRIS 3 M; concentración final en la cubeta 25-30 mM) con el fin de encontrar un valor mínimo de fluorescencia al quelar el Ca^{2+} y dejar libre la molécula de fura-2.

Todos los experimentos fueron realizados dentro de las 2 horas siguientes a la incubación de las células con el indicador. El cálculo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se realizó mediante el empleo de la siguiente fórmula:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \frac{S_f}{S_b}$$

Las determinaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se llevaron a cabo tanto en células en reposo como tras su estimulación con ACh a las dosis de 10^{-5}M , 10^{-6}M y 10^{-7}M , histamina y los agonistas de los receptores de la histamina 2-PEA, dimaprit y α -metilhistamina, también a las dosis de 10^{-5}M , 10^{-6}M y 10^{-7}M . Los estímulos se añadían directamente a la cubeta del espectrofluorímetro.

3.3.3.- Determinación de la concentración de magnesio intracelular.

3.3.3.1.- Introducción.

El conocimiento que actualmente se tiene sobre los papeles bioquímicos y fisiológicos de los dos principales cationes intracelulares calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) difiere en gran medida. El papel del Mg^{2+} en los procesos de exocitosis en las células acinares pancreáticas ha sido ensombrecido por los avances realizados en el conocimiento del papel que como segundo mensajero desempeña el ion Ca^{2+} .

El ion Mg^{2+} es el segundo catión divalente más abundante en las células del organismo y juega papeles de vital importancia en más de 300 procesos fisiológicos y bioquímicos incluyendo aquellos implicados en las respuestas secretoras inducidas por secretagogos en el páncreas exocrino (Wacker, 1968; Flatman, 1984). Por ejemplo el ion Mg^{2+} es liberado conjuntamente con enzimas digestivas y hormonas tras la estimulación del órgano (Neilsen y Petersen, 1972; Sullivan y col., 1974; Scheurs y col., 1976) y podría influir sobre el control de la apertura de canales para potasio (K^+) activados por Ca^{2+} (Squire y Petersen, 1987).

El ion Mg^{2+} está presente en el citoplasma de todas las células tanto en forma libre ionizada como ligado a moléculas biológicas (cargadas negativamente) como por ejemplo RNA, ATP, ADP, citrato y enzimas activadas por Mg^{2+} (Günther, 1990; Cowan, 1991). Solamente un 5-10% del contenido total de Mg^{2+} está en forma libre; así el ion Mg^{2+} está presente en las células predominantemente ligado a las moléculas con anterioridad citadas (90-95%).

Dependiendo del tipo celular, las formas libre y ligada del ion son total o parcialmente intercambiables, de manera que éste constituye un sistema amortiguador en el citoplasma celular. Es esta distribución del ion Mg^{2+} entre sus dos estados la que regula la actividad de muchas enzimas dependientes de Mg^{2+} y que están implicadas en la síntesis de proteínas, transporte de iones y otros procesos celulares. Si, por ejemplo, la capacidad de amortiguación del citoplasma es sobrepasada, el mantenimiento de la concentración de Mg^{2+} libre citoplasmático ($[Mg^{2+}]_i$) se vería apoyado por la entrada de Mg^{2+} desde el medio extracelular, o bien por su salida de la célula a través de la membrana celular (Günther, 1990).

Esta estrecha regulación de la $[Mg^{2+}]_i$ sugiere la posibilidad de que el ion Mg^{2+} posee funciones reguladoras importantes a nivel celular. Por tanto, sería interesante intentar conocer cómo está regulado el transporte del ion Mg^{2+} , al menos en las células acinares pancreáticas, especialmente porque una alteración en los niveles extracelulares de Mg^{2+} presenta acciones importantes sobre los efectos secretagogos inducidos por la movilización de Ca^{2+} y sobre sus respuestas secretoras (Francis y col., 1990; Lennard y Singh, 1991; Singh, 1992).

3.3.3.2.- Carga con el indicador.

Una vez obtenidas las células, retirando previamente un volumen que iba a ser utilizado para la determinación de los valores de autofluorescencia, se incubaron en presencia del indicador fluorescente Mag-fura-2/AM para aquellos casos en que se quería determinar variaciones en la $[Mg^{2+}]_i$. Las condiciones de carga habían sido descritas previamente y aplicadas por Raju y colaboradores en hepatocitos (Raju y col., 1989). En las incubaciones de nuestras células aplicamos las que Lennard y Singh (1991) describen con posterioridad y que fueron aplicadas a estudios en células acinares pancreáticas con pequeñas modificaciones.

Para la carga con el indicador las suspensiones celulares se incubaron en un KRH 0'5% BSA a 20°C, en presencia de 5 μ M de Mag-fura-2/AM y ácido plurónico (concentración final no superior al 0'025% v/v) durante 40 minutos en un baño con agitación (100 ciclos/min) y constante aireación con O_2 100% saturado en agua. A continuación se centrifugaban las células (4 minutos a 50 g y a 4°C), se decantaba el

sobrenadante y el sedimento era resuspendido en KRH sin BSA. Seguidamente se mantenían las células en un baño a 37°C con oxigenación (O₂ 100% saturado en agua) y constante agitación (100 ciclos/min), período que tenía una duración de 30 minutos. Esta etapa, conocida con el nombre de “cleaving”, estaba encaminada a dar tiempo a las esterasas celulares a que hidrolizaran el radical éster de la molécula de Mag-fura-2 liberando la forma ácida del indicador que de esta manera quedaría atrapada en el citoplasma, como hemos descrito anteriormente para el caso de la incubación con el indicador fluorescente para el ion Ca²⁺ Fura-2.

Analogamente se evaluó la viabilidad de las células acinares poniéndolas en presencia de azul tripan; la viabilidad de las células empleadas resultó no ser inferior al 95%.

En los experimentos destinados al seguimiento de las variaciones en la concentración de magnesio extracelular ($[Mg^{2+}]_o$) las células no se incubaban con ningún indicador. En esta serie de experimentos las células se ponían (una vez dentro de la cubeta del espectrofluorímetro) en presencia de la sal tetrapotasio de Mag-fura-2 al cual es impermeable la membrana celular y, por lo tanto, no penetra en el citosol, de manera que se mantiene en el medio extracelular. El KRH en el que se desarrollaban estos experimentos, nominalmente libre de Ca²⁺ y Mg²⁺, contenía 0.8 mM de EGTA. Las células no se suspendían en este medio hasta el mismo momento de su utilización, ya que se sabe que un exceso de tiempo en un medio desprovisto de Ca²⁺ hace que el período de tiempo en que las células son viables se acorte, y que la calidad de las mismas sea peor. Así pues, teníamos una suspensión de células acinares en un medio KRH completo y antes del inicio de cada experimento se tomaba un volumen de la suspensión acinar, se centrifugaba (4 minutos a 50 g y a 4°C) y se resuspendía en KRH en ausencia de ambos iones. Esta centrifugación se repetía una segunda vez y a continuación se depositaban en la cubeta; en este momento se añadía el indicador (Mag-fura-2 tetrapotasio) alcanzando una concentración en la cubeta de 2.5 μM. Esperábamos 2 minutos hasta su completa disolución en la suspensión acinar y comenzábamos el experimento.

3.3.3.3.- Cuantificación de la fluorescencia y $[Mg^{2+}]$.

Para la determinación de la $[Mg^{2+}]$, intra o extracelular, se depositaban alícuotas de 2 mililitros de la suspensión de células acinares en una cubeta de cuarzo en un espectrofluorímetro modelo RF-5001PC de Shimadzu; el sistema es el mismo que se empleó para la determinación de las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$, al que anteriormente nos hemos referido. Todos los experimentos se realizaron a 37°C y con agitación constante.

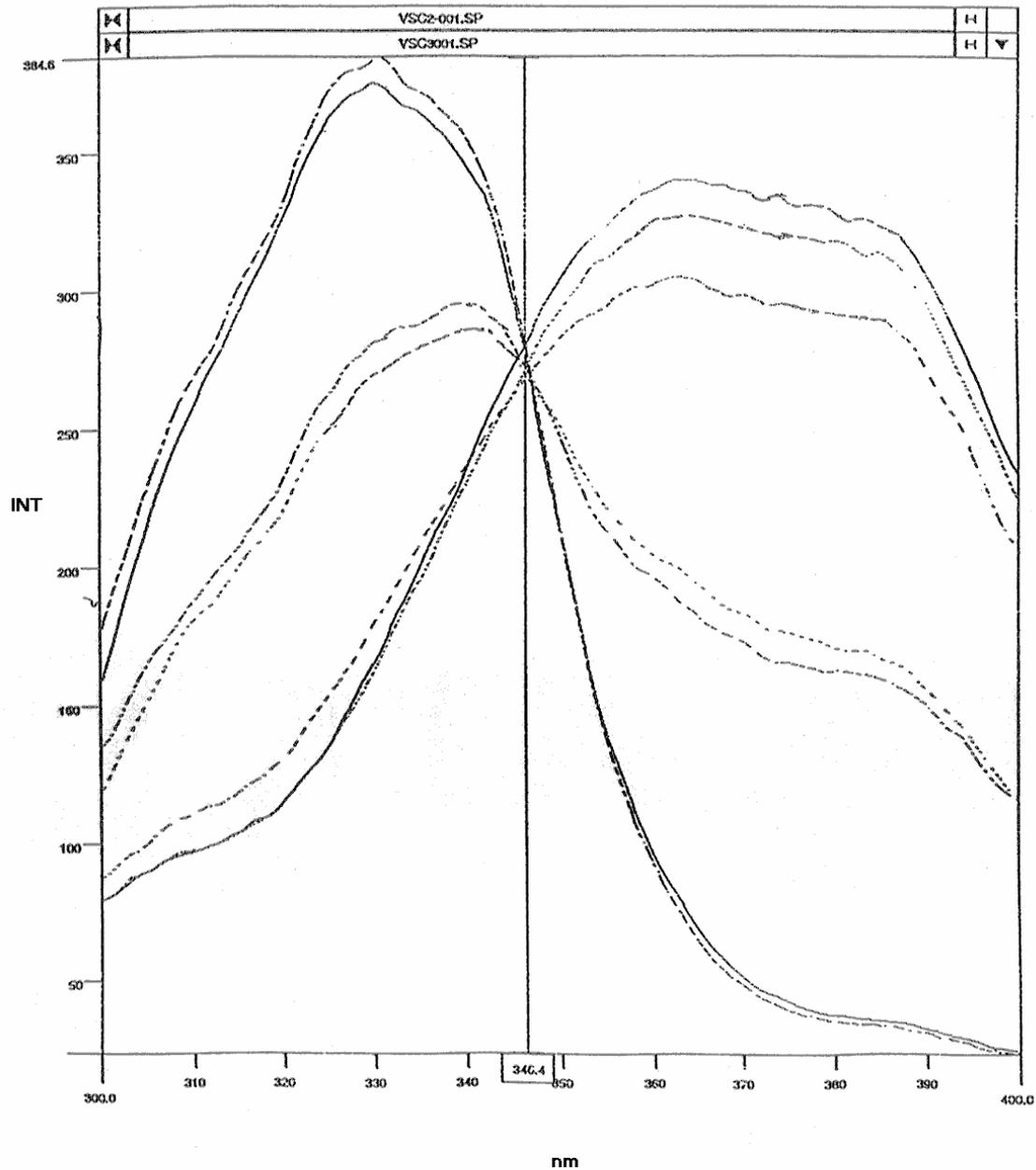


Figura 3. Cambios en la fluorescencia emitida por mag-fura-2 (2.5 μM) tras la realización de barridos (300-400 nm, emisión a 510 nm) de soluciones conteniendo diferentes concentraciones de Mg²⁺.

De igual forma que hicimos para el fura-2, realizamos una serie de barridos de excitación y emisión tanto de las células cargadas con el indicador como en presencia del la sal tetrapotasio, para hallar los valores de máxima y mínima fluorescencia. Los valores encontrados fueron, respectivamente, de 330 y 370 nm para las longitudes de onda de excitación y de 510 nm para la de emisión. Por consiguiente, las suspensiones de células serían excitadas en lo sucesivo con longitudes de onda de 330 y 370 nm (slit de 5 nm) y la fluorescencia emitida sería registrada a 510 nm (slit de 5 nm).

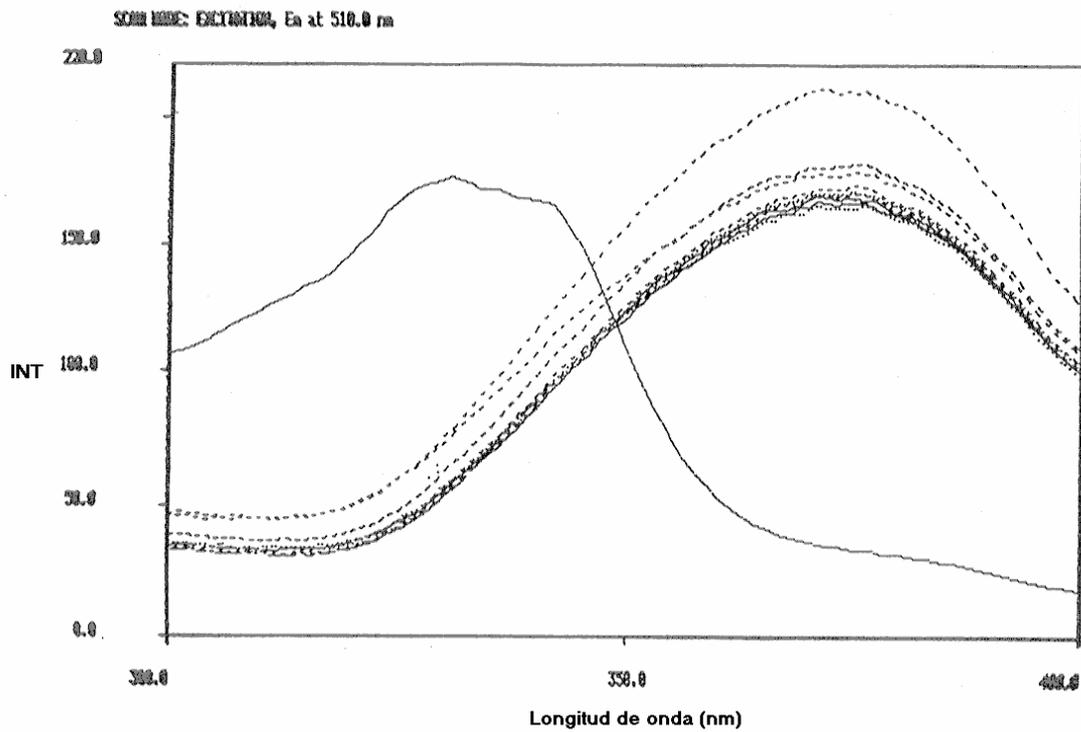


Figura 4. Cambios en la fluorescencia emitida por mag-fura-2 ($2.5 \mu\text{M}$) tras la realización de barridos (300-400 nm, emisión a 510 nm) de soluciones conteniendo diferentes concentraciones de Ca^{2+} (Kit de Calibración de Calcio, Molecular Probes Inc.[®]).

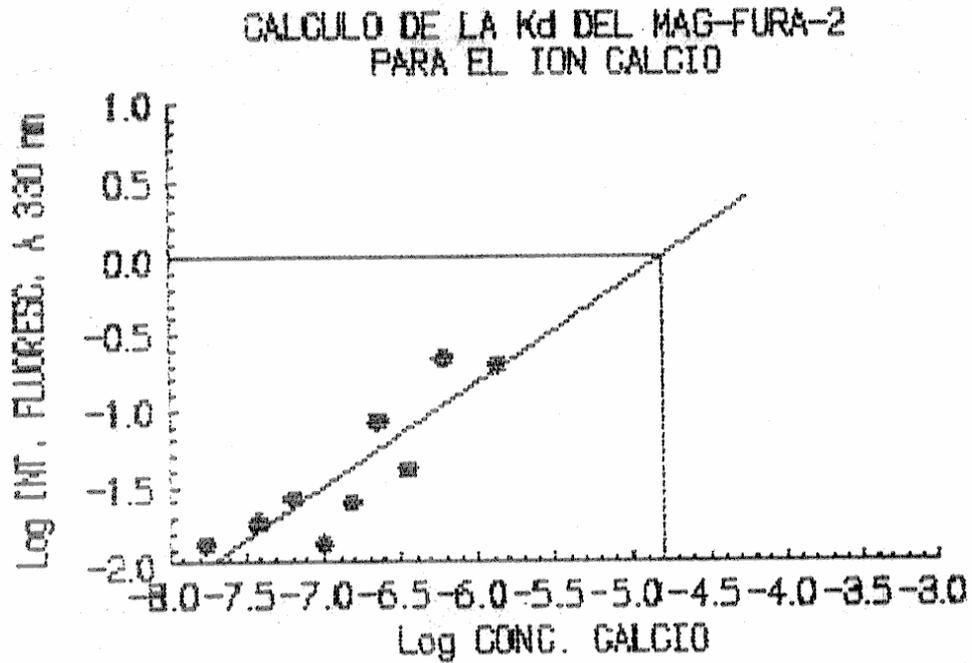


Figura 5. Representación gráfica de los cambios en la fluorescencia emitida por mag-fura-2 (eje de ordenadas) frente a las concentraciones de Ca^{2+} de las soluciones empleadas (eje de abscisas). Los valores han sido transformados y expresados en \log_{10} . El valor que adquiere la variable X cuando Y vale 0 corresponde a la K_d del mag-fura-2 para el ion Ca^{2+} .

Antes de la conclusión de los experimentos se realizaba una calibración *in-situ* para cada uno de ellos, para encontrar unos valores de fluorescencia máximos y mínimos que luego serían empleados para el cálculo de la $[Mg^{2+}]_i$. Esta calibración era similar a la utilizada para los experimentos en que determinábamos variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$; para el máximo de fluorescencia añadíamos digitonina a la cubeta (concentración final 100 μ M) para permeabilizar las células y permitir que el exceso de Mg^{2+} tuviera acceso al mag-fura-2. Cuando el nivel de fluorescencia era estable añadíamos Tritón X-100; nuevamente las señales de fluorescencia registradas demostraron una mínima compartimentalización del indicador. En los experimentos realizados con la sal tetrapotasio de mag-fura-2, el máximo de fluorescencia se obtenía añadiendo a la cubeta Cl_2Mg (50 μ l de una solución 200 mM; concentración final en la cubeta 5 mM).

Una vez que la señal de fluorescencia era estable se añadió en ambos casos EDTA (concentración final en la cubeta 10 mM) para encontrar un valor mínimo de fluorescencia con el que completar la calibración.

De igual manera que se hizo para las determinaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ se realizaron barridos (longitudes de onda de excitación de 300 a 400 nm, y emisión 510 nm) de soluciones con concentraciones crecientes de Mg^{2+} (figura 3) y en presencia de la sal tetrapotasio de mag-fura-2 (2'5 μ M). De los mismos obtuvimos una K_d del mag-fura-2 para el magnesio de 1'5 mM, valor que en lo sucesivo sería utilizado para la realización de los cálculos pertinentes. Igualmente realizamos las mismas operaciones con concentraciones crecientes de Ca^{2+} (figura 4) y en presencia de mag-fura-2 tetrapotasio (2'5 μ M) encontrando una K_d del mag-fura-2 para el ion Ca^{2+} de 15'35 μ M (figura 5), determinaciones realizadas a 37°C.

El cálculo de la $[Mg^{2+}]_i$ se realizó a partir del ratio de fluorescencia obtenido a las dos longitudes de onda de excitación, previa substracción de los valores de autofluorescencia, como se ha descrito previamente (Grynkiewicz y col., 1985), mediante el empleo de la siguiente fórmula:

$$[\text{Mg}^{2+}] = K_d \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \frac{S_f}{S_b}$$

Todas las determinaciones se llevaron a cabo dentro de las 2 horas siguientes a la incubación con el indicador.

Las determinaciones de las $[\text{Mg}^{2+}]_i$ y $[\text{Mg}^{2+}]_o$ se llevaron a cabo tanto en células en reposo como tras su estimulación con ACh, CCK-8 e histamina a las dosis de 10^{-5}M , 10^{-8}M , 10^{-4}M respectivamente, tanto en presencia como en ausencia de Mg^{2+} en el medio fisiológico utilizado. Los estímulos se añadían directamente a la cubeta del espectrofluorímetro.

3.4.- Experimentos con células aisladas.

3.4.1.- Aislamiento de las células acinares pancreáticas.

Una variante de la técnica descrita al comienzo de esta sección de material y métodos se empleó para la obtención de células pancreáticas aisladas en esta última fase de la parte experimental. La solución fisiológica utilizada era un tampón (Mix buffer) con la composición que se detalla en la tabla II.

Reactivo	ml	Conc. final (mM)
MJJ	200	
HEPES (154 Mm)	38,67	24
KH ₂ PO ₄ (217 mM)	2,4	2
MgCl ₂ (120 mM)	2,4	1,2
BME Vitamin. sol.	2,4 ml	1%
Glutamina	0,073 g	0,03%

Tabla II. Composición del medio mix buffer empleado para el aislamiento de las células acinares pancreáticas.

El pH de esta solución se ajustaba a 7'45 con NaOH 10 N.

Esta solución era dividida en tres particiones:

Tampón de lavado: 100 ml conteniendo 2 mM de CaCl₂ y 0'2% (p/v) BSA.

Tampón de incubación: 50 ml conteniendo 0'5 mM CaCl₂ y 1% (p/v) BSA.

Tampón de parada o "stop": 50 ml conteniendo 2 mM CaCl₂ y 4% (p/v) BSA.

La composición del medio MJJ empleado para la elaboración de la solución anterior es la que se describe en la tabla III.

Reactivo	P. molec.	mM
NaCl	58,44	120
KCl	74,55	7,2
Na-piruvato	110,04	6
Na-fumarato	160,04	7,1
Na-glutamato	187,14	6
D-glucosa	180,16	14
Inhib. tripsina		1 mg/ml
BME A.a.		1 ml/L

Tabla III: Composición del medio MJJ empleado para la elaboración del medio Mix-Buffer empleado en el aislamiento de las células acinares pancreáticas..

El procedimiento utilizado para la obtención de las células pancreáticas aisladas es el siguiente:

El páncreas procedente de una rata se fija sobre una placa de disección y se inyecta con 6 mililitros de tampón de lavado conteniendo colagenasa CLSPA de Worthington (dilución de colagenasa: 150 μ l de una solución stock con 5 U de colagenasa por ml en 20 ml de tampón de lavado); esta operación había que realizarla con atención para que los lóbulos pancreáticos quedasen bien separados, de manera que la digestión con la enzima fuese lo más completa posible.

A continuación se introducía el páncreas en un matraz Erlenmeyer (25 ml de capacidad) junto con la solución de colagenasa sobrante, se oxigenaba con O₂ 100% y tras cerrar el matraz para evitar pérdidas del contenido se incubaba en un baño en agitación (200 ciclos/min) a 37°C durante 10 minutos. Terminado este primer período se decantaba el sobrenadante y se añadían 5 ml de la solución de colagenasa, se oxigenaban y se repetía la incubación bajo las mismas condiciones que la anterior. Esto se repetía una tercera vez; al término de la tercera incubación el sobrenadante presenta un aspecto opalescente.

El siguiente paso consistía en agitar vigorosamente el matraz golpeándolo contra la palma de la mano para disgregar aún más el pancreas y obtener los acinos. Esta operación se practicaba hasta que no se observaran fragmentos grandes del tejido en la suspensión. A continuación se transfiere el contenido del matraz a tres tubos de plástico (15 ml de capacidad) que contienen cada uno 10 ml de tampón stop. En estos tubos se irán depositando los fragmentos de tejido de mayor tamaño en el fondo, los cuales retiraremos con la ayuda de una pipeta pasteur transfiriéndolos a un cuarto tubo también con tampón stop.

Los fragmentos que se han depositado en el fondo de este último tubo los retirábamos para quedarnos únicamente con los elementos en suspensión; el paso siguiente era realizar una centrifugación de los cuatro tubos a 50 g, a 4°C durante 2 minutos. Seguidamente descartamos el sobrenadante, resuspendíamos con tampón de lavado y repartíamos el contenido de uno de los tubos entre los otros tres. Centrifugábamos de nuevo y repetíamos la operación hasta quedarnos con un solo tubo en el que se encontraban todos los acinos que habíamos obtenido.

Para terminar centrifugábamos una vez más para resuspender el precipitado en tampón de incubación, medio en el cual íbamos a realizar un pipeteo de los acinos a través de puntas de pipeta flameadas con diámetros decrecientes (3 a 1 mm) de igual manera que lo realizamos para los experimentos en que trabajábamos con suspensiones acinares; como la finalidad en este momento era la de obtener el mayor número posible de células aisladas, esta labor la practicábamos con un grado de intensidad algo superior al descrito anteriormente.

Concluida esta operación la suspensión de células era filtrada a través de una gasa doble y posteriormente se centrifugaba para en un último paso resuspenderlas en un tampón Na-HEPES donde permanecerían hasta el momento de utilizarlas.

Este tampón presenta la composición descrita en la tabla IV.

Reactivo	P. molec.	mM
NaCl	58,44	140
KCl	74,56	4,7
MgCl ₂	203,31	1,13
HEPES	238,31	10
D-glucosa	180,16	10
CaCl ₂		1,1
Inh. trips.		0,1 g/L

Tabla IV. Composición del medio Na-Hepes empleado en la realización de los experimentos con células acinares pancreáticas aisladas.

El pH de esta solución era titrado a 7'3-7'4 usando NaOH 10 N.

La viabilidad de las células obtenidas por este método no presentaba grandes diferencias con respecto a la de las obtenidas por la técnica descrita en otro capítulo de esta sección, manteniéndose en torno al 95% ante su ensayo con azul tripan.

3.4.2.- Seguimiento continuo de la fluorescencia en células aisladas.

Se colocaban alícuotas de la suspensión celular sobre un cubre-objetos circular de 22 milímetros de diámetro dentro de una cámara de perfusión fabricada para este propósito; el volumen total interno de la misma no superaba los 250 μ l. A su vez la cámara de perfusión estaba montada sobre la platina de un microscopio invertido de fluorescencia Diaphot 300 de NIKON[®], equipado con un objetivo NIKON[®] Fluor X40 para fluorescencia. Las células acinares pancreáticas se perfundían con un tampón Na-HEPES a una velocidad de flujo de 1'5-2 ml/min, lo que permitía renovar completamente el contenido de la cámara cada 10-15 segundos. Estas soluciones contenían los agentes que se querían ensayar y estaban atemperadas a 37°C mediante el empleo de un sistema fabricado por nosotros mismos y que se detalla en el esquema de la figura 6.

Para el análisis de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ se utilizó un sistema de detección multipunto NPS que emplea una cámara enfriada CCD que permite monitorizar simultáneamente hasta 16 áreas dentro del campo del microscopio. Este sistema fue adquirido en Newcastle Photometric Systems.

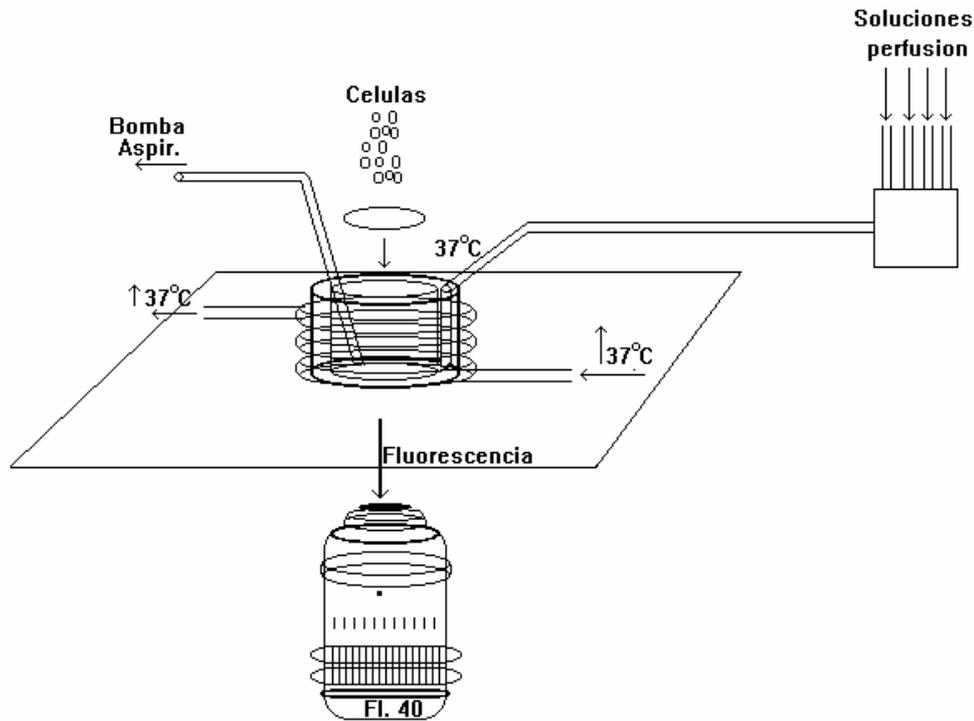


Figura 6. Esquema empleado para el seguimiento de la fluorescencia en células aisladas. Consta de una cámara de perfusión atemperada a 37°C mediante la recirculación de agua caliente a su alrededor. En su interior y sobre un cubreobjetos circular se depositan las células acinares pancreáticas, que se perfundirán con diferentes soluciones también atemperadas. El sistema de perfusión está colocado sobre la platina de un microscopio invertido de fluorescencia.

El sistema nos permitía detectar cambios en la fluorescencia emitida por el indicador en respuesta su excitación con luz procedente de una lámpara de xenon de arco corto de 100 watios. La excitación se cambiaba alternativamente mediante el empleo de dos filtros de 25 milímetros de diámetro, montados sobre una rueda que era capaz de girar y cambiar las posiciones de cada uno de los filtros en 300 milisegundos, al estar equipada con un servomotor controlado mediante software. La luz de longitud de onda deseada se dirigía hacia la muestra mediante el empleo de un espejo dicróico (DM 400). La fluorescencia emitida se recogía a una longitud de onda por encima de 510 nm por medio de un filtro barrera situado bajo el espejo dicróico y se dirigía hacia la cámara.

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

3.4.3.- Análisis digital de la $[Ca^{2+}]_i$.

3.4.3.1.- El sistema de detección.

El sistema de detección multipunto NPS emplea una cámara de integración refrigerada (Peltier Cooled Slow Scan CCD) para análisis de imagen, permitiendo capturar fotones de imágenes con bajo nivel de fluorescencia. Los tiempos de exposición pueden variar desde 50 milisegundos hasta varios segundos, lo que permite una mejora considerable en la relación señal/ruido.

La imagen es digitalizada con una resolución de 16 bit comparado con los 8 bit que proporcionan los sistemas basados en cámaras de vídeo. Esto elimina la necesidad de complejos procedimientos de ajuste pues el rango dinámico de la cámara es suficiente para detectar cualquier variación en la fluorescencia. Este rango aumentado de digitalización de las imágenes proporciona una gama de 65536 grises en comparación con los 259 que permiten los sistemas convencionales de 8 bit. Con ello es posible la detección y cuantificación precisa de cambios relativamente pequeños en la intensidad de fluorescencia con la máxima sensibilidad pero sin la introducción de artefactos e interferencias no deseables.

El sistema está manejado por un software desarrollado para el seguimiento de la fluorescencia emitida por hasta 16 regiones de interés en el campo de estudio y mostrar los valores en tiempo real. El programa permite almacenar imágenes individuales y también pares de imágenes durante la realización de los experimentos, estando limitado el número que se pueden almacenar únicamente por la capacidad del disco duro del ordenador conectado al sistema.

Dentro del campo de estudio, las 16 regiones de interés se seleccionan mediante el sencillo uso de un ratón. Una vez comenzado el experimento es posible realizar un seguimiento de la fluorescencia emitida en cada región empleando hasta 4 longitudes de onda de excitación diferentes. El sistema está particularmente adaptado para el trabajo con fluoróforos de dos longitudes de onda de excitación (fura-2, mag-fura-2, BCECF, SBFI,...). Las imágenes para cada longitud de onda pueden ser capturadas y almacenadas cada 500 milisegundos, por lo tanto los valores de los ratios de fluorescencia, en un experimento con doble longitud de onda, pueden ser detectados y mostrados cada segundo.

3.4.3.2.- El software.

El software (Camera System, versión 6'61, de Newcastle Photometric Systems) está desarrollado para tener un uso sencillo de manera que sea posible un comienzo rápido de los experimentos y la toma de datos de interés. Mediante el empleo del teclado se manejan las instrucciones necesarias para la consecución de los experimentos, permitiendo definir el tiempo de exposición de la cámara, las combinaciones de los filtros, la ganancia, la duración del experimento y el tipo de gráfico (ratio y/o longitudes de onda) que se quiere observar durante el experimento.

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

También es posible realizar marcas de tiempo para identificar acontecimientos de interés ocurridos a lo largo de los experimentos (por ejemplo, cambios de soluciones,

administración de drogas, etc.). Esta información es almacenada automáticamente y puede ser editada en cualquier momento para su uso al término de cada sesión.

Los datos son almacenados de manera que sean fácilmente identificables, impresos o exportados en formato ASCII para su tratamiento con otros programas.

3.4.3.3.- Captura de imágenes y análisis.

En cualquier momento del experimento se pueden tomar imágenes para tener constancia de cualquier acontecimiento sucedido durante la sesión; estas imágenes pueden ser capturadas tanto con baja (192x288) como con alta (384x576) resolución, y son mostradas en la pantalla del ordenador usando una paleta de pseudocolores, la cual también puede ser objeto de manipulación para mejorar la información contenida en la imagen mostrada.

Así mismo las imágenes manipuladas pueden ser archivadas e incluso impresas en una escala de grises o de colores dependiendo del tipo de impresora de que se disponga.

Es posible también exportar las imágenes en formato BMP para permitir un mejor análisis por otros programas destinados para este fin.

3.4.4.- Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$.

3.4.4.1.-Carga con el indicador.

Las condiciones de carga con el indicador ya han sido descritas anteriormente cuando nos referimos a los experimentos realizados en suspensiones acinares.

3.4.4.2.- Cuantificación de la fluorescencia y $[Ca^{2+}]_i$.

Aun cuando el sistema de detección de las variaciones en la intensidad de la fluorescencia emitida por la molécula de fura-2 es diferente comparándolo con el espectrofluorímetro en que se realizaron los experimentos con suspensiones acinares, se siguieron los mismos protocolos experimentales para el seguimiento de las variaciones en la concentración de este segundo mensajero (Grynkiewicz y col., 1985). La calibración se realizó independientemente obteniendo los valores de R_{max} y R_{min} en el

interior de las células; para obtener el máximo de fluorescencia no se podía emplear digitonina como en los experimentos con suspensiones celulares ya que el fura-2 se perdería en la cámara de perfusión, con lo que se perfundieron las células con una solución 2 μM de ionomicina en presencia de 10 mM de CaCl_2 , mientras que para hallar el mínimo se perfundieron con una solución conteniendo 10 mM de EGTA.

El cálculo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se realizó mediante el empleo de la siguiente fórmula:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \frac{S_f}{S_b}$$

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

Con esta metodología se evaluó la influencia que presentaban sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ las variaciones inducidas en el pH_i mediante la perfusión de las células con soluciones de NH_4Cl 30 mM o propionato sódico 15 mM, así como con NMDG (compuesto que bloquea el intercambiador Na^+/K^+ , acidificando el medio intracelular); igualmente se pretendía estudiar el grado de afectación de los mecanismos oscilatorios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Así mismo se realizó un estudio sobre la influencia que los citados cambios producidos en el pH_i presentaban sobre la entrada de Ca^{2+} en las células una vez vaciados los depósitos citoplasmáticos.

3.4.5.- Determinación de las variaciones de ph intracelular.

3.4.5.1.- Introducción.

La regulación del pH intracelular (pH_i) ha sido objeto de gran estudio a lo largo de los últimos años y se han realizado considerables avances encaminados al conocimiento de los mecanismos celulares que existen para su regulación. Principalmente, esta mejora que se tiene de la información sobre la regulación del pH_i ha sido posible gracias al empleo de técnicas que permiten la determinación de cambios pequeños en la concentración de hidrogeniones ($[\text{H}^+]$) en el medio intracelular. Posiblemente el más fructífero avance ha sido el posibilitado por el desarrollo de microelectrodos sensibles a pH . La resonancia magnética nuclear (NMR) y la espectrofluorimetría son técnicas que

también han contribuido al avance de nuestro conocimiento y representan sólidas promesas para el futuro.

Se han realizado nuevos hallazgos sobre la regulación del pH_i mediante el tratamiento de las células con ácidos y bases débiles, efectos de la temperatura sobre la regulación del pH_i , estudios sobre la capacidad de amortiguamiento del medio intracelular, ensayo sobre orgánulos celulares, etc. Finalmente, las implicaciones de la regulación del pH_i sobre fenómenos como la contracción muscular o los procesos de secreción están adquiriendo actualmente la mayor relevancia.

Existen numerosas propiedades y procesos celulares que se ven afectados por una variación en el pH como la permeabilidad y conductancia de la membrana celular, propiedad explicada a menudo por la posible presencia de cargas fijas que atraen, interactúan y proporcionan paso a los ligandos cargados de signo contrario; como ejemplo sirvan los ensayos que fueron realizados en 1967 sobre la influencia del pH extracelular (pH_o) sobre la conductancia de la membrana celular (Hutter y Warner, 1967a;b), o los realizados sobre neuronas en los que se encontró un incremento en la permeabilidad a los iones K^+ cuando aumentaban los niveles de Ca^{2+} intracelular (Krnjevic y Lisiewicz, 1972; Meech, 1972).

Otro fenómeno influido por el pH_i es el acoplamiento célula-célula, proceso que ha revelado una cierta relación $\text{Ca}^{2+}/\text{pH}_i$ como se desprende de los estudios realizados sobre células nerviosas de caracoles (Thomas, 1974; Meech y Thomas, 1977).

Además de los anteriores los mecanismos de secreción y reabsorción de ácido en diferentes epitelios han sido objeto de investigaciones sucesivas.

Independientemente del tipo de epitelio de que se trate la regulación del pH_i desempeña un importante papel en la génesis y control del transporte de ácido (Al-awqati, 1978; Warnock y Rector, 1979; Kinsella y Aronson, 1980) de manera que la secreción de ácido sería estimulada por cualquier proceso que estimule un intercambio Na^+/H^+ .

En la fisiología celular existen numerosas interacciones entre el pH y los procesos metabólicos. Los centros activos de las enzimas a menudo contienen grupos cuyo estado

de ionización puede afectar a la conformación de la enzima y así a sus propiedades catalíticas o su capacidad de unión del sustrato (Danforth, 1965). Por el otro lado, los procesos metabólicos por sí mismos con frecuencia generan cambios de pH debido a la producción o liberación de CO_2 y H^+ .

Más aún, procesos como la fertilización se acompañan de cambios en el pH_i y se ha sugerido que es debida a la activación de un intercambiador Na^+/H^+ que hace que se incremente el pH_i y por lo tanto se desencadene el desarrollo del embrión (Buytendijk y Woederman, 1927; Johnson y col., 1978).

Igualmente las propiedades mecánicas del músculo, tanto cardíaco como esquelético, se ven afectadas por las variaciones que se puedan producir en el pH_i (Creese, 1950; Steenbergen y col., 1977).

Se ha propuesto que los cambios que se producen en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y pH_i durante la estimulación celular funcionan como señales intracelulares en gran variedad de tipos celulares, y es la liberación de Ca^{2+} y recarga de los depósitos la que podría requerir un flujo compensador de protones en dirección opuesta para mantener la electroneutralidad. Así, experimentos realizados en acinos de parótida han hecho pensar que tanto la bomba de Ca^{2+} como una de H^+ están localizadas en el depósito de Ca^{2+} que es sensible al IP_3 (Thévenod y Schulz, 1988).

En el retículo sarcoplásmico de células cardíacas, donde la bomba de Ca^{2+} funciona como un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (Levi y col., 1990), se ha observado una acidificación en el citoplasma celular en respuesta a diferentes agonistas, y esta acidificación conduce a una liberación de Ca^{2+} desde los depósitos. En el acoplamiento estímulo-contracción una disminución en el pH_i facilita la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (Orchard y col., 1987), y en el acoplamiento estímulo-secreción la acidificación del citoplasma inducida tras la administración de gastrina o trombina podría estar asociada a la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares tanto en células parietales como en plaquetas (Tsunoda y col., 1991). También se han observado estos efectos en neutrófilos (Cox y col., 1984).

Pero también existen argumentos que cuestionan si esta reducción del pH_i es un requisito indispensable para la movilización de Ca^{2+} . En células endoteliales de bovino la alcalinización del citoplasma conduce a la movilización de Ca^{2+} procedente de los depósitos intracelulares (Danthuruli y col., 1990), como también se ha descrito en fibroblastos de aves (Dickens y col., 1990), células de músculo liso (Siskind y col., 1989) y plaquetas (Zavoico y col., 1986; Siffert y Akkerman, 1987). Así el pH_i es un arma de doble filo en lo relacionado con los sistemas de transporte en los diferentes tipos celulares.

Nosotros hemos realizado una serie de ensayos en nuestro laboratorio para intentar conocer algo más sobre la interrelación $\text{Ca}^{2+}/\text{pH}_i$ en las células acinares pancreáticas si bien ya se han realizado estudios previos sobre este mismo campo (Tsunoda, 1990; Tsunoda y col., 1991; Muallem y Loessberg, 1990).

3.4.5.2.- Carga con el indicador.

Para la monitorización de las variaciones de pH_i que se producían en las células acinares pancreáticas en respuesta a los diferentes tratamientos ensayados se empleó el indicador fluorescente 2',7'-bis(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína triacetoximetil ester (BCECF/AM).

Se sometieron alícuotas de suspensiones celulares a varios protocolos de carga para obtener las condiciones adecuadas. Las suspensiones celulares se incubaron a temperatura ambiente (20-25°C) o a 37°C durante diferentes períodos de tiempo en medios conteniendo varias concentraciones del indicador. Tras la incubación las células se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en medio Na-Hepes sin BSA, operación que se repitió una segunda vez. Por homología con la incubación con los indicadores para el Ca^{2+} y el Mg^{2+} unos grupos se sometieron a una incubación posterior a 37°C para la deesterificación del indicador. Después de este periodo de "cleaving" se procedió a la centrifugación de la suspensión celular y se resuspendieron en Na-Hepes libre de BSA.

A continuación se cuantificó la fluorescencia emitida por las muestras así como una valoración de la viabilidad y aspecto de las células. Se obtuvieron buenas señales de

fluorescencia junto con mínimos signos de daño celular y compartimentalización en aquellos protocolos en que las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y en presencia de una concentración 5 μM de BCECF/AM, sin posterior período de “cleaving”, condiciones que en lo sucesivo serían empleadas para la carga con el indicador.

3.4.5.3.- Cuantificación de la fluorescencia y determinación de los valores de pH_i .

En una primera instancia intentamos determinar variaciones de pH_i en suspensiones de células acinares pancreáticas, empleando nuestro espectrofluorímetro. Para ello las suspensiones acinares eran excitadas alternativamente a 490/440 nm y la fluorescencia emitida medida a 520 nm. Del mismo modo que habíamos hecho para la determinación de las concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y $[\text{Mg}^{2+}]_{i,o}$, realizamos una calibración de nuestro sistema de detección para poder expresar los valores de fluorescencia obtenidos en unidades absolutas de pH.

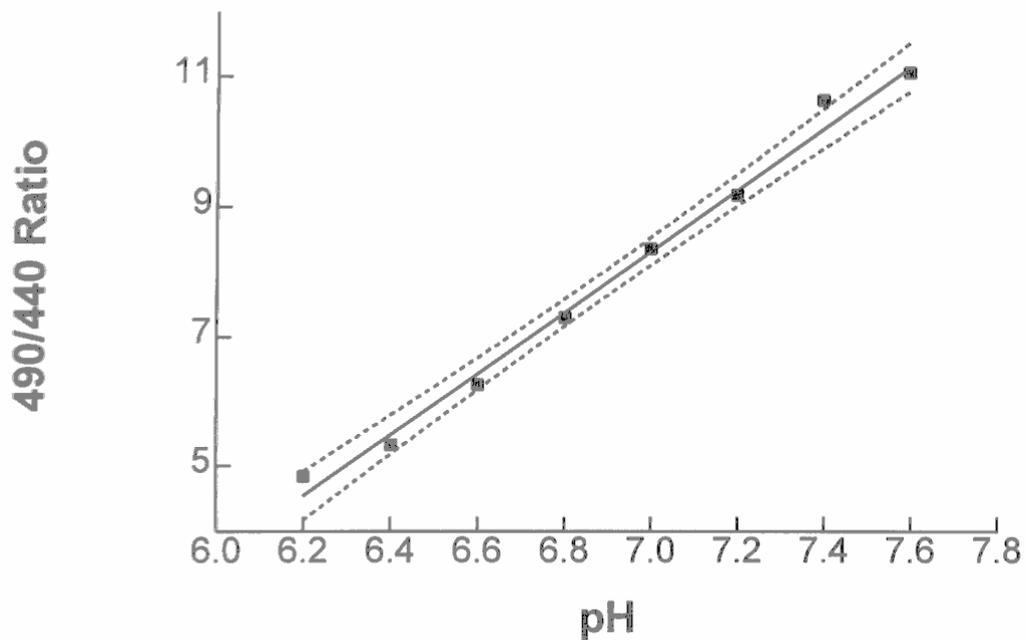


Figura 7. Representación gráfica de los cambios en la fluorescencia emitida por BCECF (eje de ordenadas) frente al pH de las soluciones empleadas (eje de abscisas), en la cubeta de un espectrofluorímetro modelo RF-5001-PC. Los valores de fluorescencia se expresan como el ratio de la fluorescencia emitida a ambas longitudes de onda de excitación (490/440 nm).

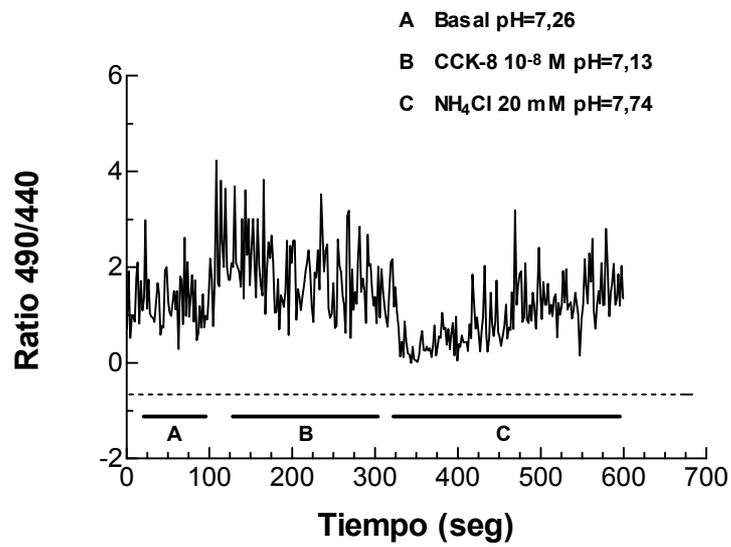


Figura 8. Ejemplo de determinación de variaciones de pH_i en suspensiones acinares. **A**, período basal; **B**, adición a la cubeta de CCK-8 10^{-8} M; **C**, adición a la cubeta de NH_4Cl 20 mM.

Para la calibración, las células cargadas con el indicador BCECF (5 μ M) se ponían en un medio de la siguiente composición (en mM): KCl (145), MgCl₂ (1), CaCl₂ (1), HEPES (10), D-glucosa (10) y nigericina a una concentración de 10 μ M. Estas soluciones eran tituladas a pH entre 6'4 y 8'0, técnica descrita y empleada en otras determinaciones de pH_i por otros autores (Thomas y col., 1979). En estas condiciones se asume que el pH_i se iguala al pH de la solución externa.

Representando el ratio de las intensidades de fluorescencia obtenidas a cada una de las longitudes de onda de excitación (490/440) frente al pH de las soluciones empleadas obteníamos una curva de calibración ($r^2 = 0'99$) (figura 7) que nos permitiría posteriormente expresar los datos de pH_i en valores absolutos. Como ejemplo de determinación de variaciones de pH_i en suspensiones acinares sirva el representado en la figura 8, donde las células acinares pancreáticas fueron estimuladas con CCK-8 10⁻⁸M (tramo B) y posteriormente se añade NH₄Cl (20 mM) (tramo C). Los valores de ratio transformados en unidades de pH_i se muestran también en la figura.

Debido a que había determinados tratamientos que no podíamos realizar en la cubeta (por ejemplo cambio de tratamientos) y por la baja sensibilidad del sistema en la mayoría de los experimentos, decidimos no continuar con las determinaciones en cubeta y realizarlas en células aisladas. Además esto permite la observación de cambios de pH_i en células individuales en lugar de estimar el comportamiento de una población celular.

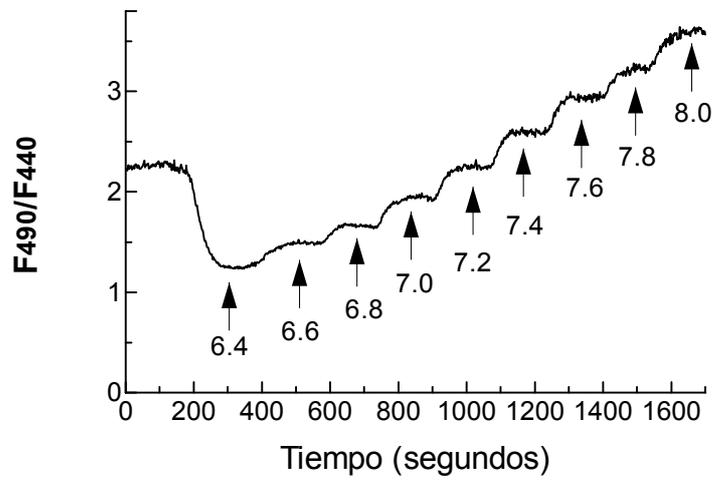


Figura 9. Registro representativo de las variaciones obtenidas en los ratio de fluorescencia (490/440) en un experimento típico de calibración para pH_i . Las células acinares pancreáticas aisladas se perfundían sucesivamente con soluciones conteniendo (en mM): KCl (145), $MgCl_2$ (1), $CaCl_2$ (1), HEPES (10), D-glucosa (10) y nigericina a una concentración de $10 \mu M$. Estas soluciones eran tituladas a pH entre 6'4 y 8'0.

Para la cuantificación de la fluorescencia en células aisladas, se depositaron alícuotas de 120 μl de suspensión de células acinares sobre un cubreobjetos circular de 22 milímetros de diámetro colocado dentro de una cámara de perfusión hecha por nosotros mismos. El volumen interno no superaba los 250 μl . Esta cámara de perfusión estaba, a su vez, colocada sobre la platina de un microscopio invertido de fluorescencia y las células eran perfundidas con soluciones atemperadas a 37°C a una velocidad de flujo de 1'5-2 ml/min.

Las células eran excitadas alternativamente a 440/490 nm y la fluorescencia emitida era recogida a 520 nm. Los valores de pH_i se calcularon a partir de los ratios de la fluorescencia emitida a las dos longitudes de onda de excitación (440/490).

Nuevamente tuvimos que realizar una calibración del sistema de medida. Para ello perfundíamos las células con soluciones de la composición mencionada más arriba, tituladas igualmente a diferentes pH. En la figura 9 se muestra un registro representativo de las variaciones de los ratios de fluorescencia en un experimento típico de calibración.

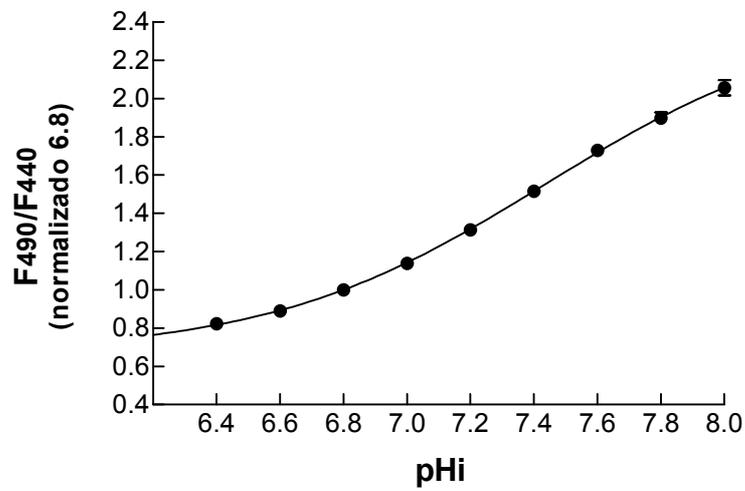


Figura 10. Curva de calibración utilizada para la transformación de los valores de fluorescencia de BCECF obtenidos, en valores reales de pH. Cada punto representa la media \pm EEM de 57 células en un total de 6 experimentos diferentes.

Para poder expresar los resultados en unidades absolutas de pH se ajustó una curva sigmoidea a los resultados de las calibraciones, utilizándola como curva patrón (figura 10) para transformar los resultados de cada experimento en unidades de pH. Debido a que cada célula posee gran variación en el ratio de fluorescencia en estado basal (Frelin y cols., 1988), fue necesaria la realización al final de cada experimento de una calibración individualizada para cada célula a $\text{pH}_o = 6.8$, en presencia de nigericina, siguiendo el protocolo previamente descrito. Por tanto, todos los resultados, incluidos los de las calibraciones, fueron normalizados respecto al pH de 6.8, reduciendo así la variabilidad que presentaban los resultados.

La fluorescencia de las células no cargadas con el indicador era inferior al 3-5% de la obtenida con células cargadas con BCECF, y con la perfusión continua de las mismas se eliminaba el indicador que escapaba de las células, por lo tanto no empleamos sus valores en la corrección de las señales de fluorescencia. Todos los experimentos fueron realizados en el transcurso de las 2 horas siguientes a la incubación con el indicador.

El objeto de nuestro estudio en este punto de la parte experimental fue el de enfocar el posible mecanismo por el que la estimulación de las células acinares pancreáticas con los secretagogos clásicos ACh y CCK-8 conduce a una acidificación del citoplasma celular. Se ensayaron dosis tanto máximas como fisiológicas de ambos secretagogos.

Dado que la vía de acoplamiento que utilizan estos agentes implica la homeostasis del ion Ca^{2+} , tratamos de encontrar una posible relación entre las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y las de pH_i . De esta manera se emplearon agentes que actúan incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como la ionomicina o la tapsigargina y/o el ácido ciclopiazónico, que bloquean la bomba de Ca^{2+} del retículo; valoramos el efecto que la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mediante técnicas que no activan los receptores de la membrana celular o las proteínas G, presentaba sobre el pH_i . En este punto nos planteamos si la CCK-8 produce acidificación del citosol por la movilización de Ca^{2+} o por otro mecanismo. Así, junto con el protocolo anterior, empleamos unas técnicas que permitían la acidificación del medio intracelular, para tras su aplicación evaluar el efecto que la administración de CCK-8 presentaba sobre el pH_i .

Otro fenómeno que tiene lugar en estas células tras el vaciamiento de los depósitos es la recarga de los mismos, a expensas de la entrada de Ca^{2+} procedente del medio extracelular. Tras la estimulación de las células en un medio libre de Ca^{2+} o mediante el bloqueo de la bomba del retículo en un medio libre de Ca^{2+} los depósitos intracelulares son vaciados; se evaluó el efecto que la reposición del Ca^{2+} en el medio de perfusión, y por tanto la entrada de Ca^{2+} , presentaba sobre el pH_i . Esta parte se vio completada por ensayos en los que se bloqueaba la bomba de Ca^{2+} presente en la membrana plasmática empleando LaCl_3 o un pH_o alcalino ($\text{pH}_o=8$).

En una última fase de esta parte experimental se ensayó el efecto que la estimulación de la PKC presentaba sobre el pH_i , así como el efecto que las variaciones de volumen celular y la despolarización de las células con soluciones de alto contenido en K^+ presentaban sobre este parámetro.

3.5.- Tratamiento estadístico de los resultados.

Los resultados obtenidos en los experimentos se han expresado en valores absolutos, representándose en las gráficas registros representativos de los diferentes tratamientos. En el texto y las tablas se muestran los resultados como la media y el error estándar de la media, obtenidos utilizando el total de células estudiadas. Salvo que se indique lo contrario en el texto o en los pies de figura todos los datos provienen de 4 experimentos independientes.

En aquellos casos en que se analizó la diferencia existente entre diferentes tratamientos, se utilizó el test de la t de Student. Para comparar diferencias entre frecuencias de respuesta se empleó la χ^2 , calculada mediante tablas de contingencia 2 x 2.

Para la análisis de los resultados de las calibraciones se utilizó el cálculo por medio de regresión no lineal.

4.- RESULTADOS

4.1- Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ en suspensiones acinares.

4.1.1.- Efecto de la ACh sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

La $[Ca^{2+}]_i$ en las células acinares pancreáticas en estado de reposo resultó ser $93'15 \pm 1'22$ nM (n=15). La estimulación con una concentración de 10^{-5} M de ACh produjo un rápido y marcado incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, alcanzando un valor máximo de $326'76 \pm 25'95$ nM ($p < 0.05$) (n=6) a los 3-5 segundos de la adición del estímulo a la cubeta (figura 1 A). Este aumento era seguido de una progresiva disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ hasta alcanzar un valor estable aproximadamente a los 5 minutos de la estimulación, valor que se situaba ligeramente por encima del basal ($139'71 \pm 13'19$ nM; n=6).

La estimulación de las células acinares con concentraciones menores de ACh condujo a un patrón de movilización de Ca^{2+} similar, pero de menor amplitud, alcanzándose valores máximos de $[Ca^{2+}]_i$ inferiores, comparados con los producidos por la estimulación con ACh 10^{-5} M; estos valores fueron de $203'76 \pm 25'23$ nM (n=5) para 10^{-6} M (figura 1 B) de ACh y $109'47 \pm 12'99$ nM (n=5) para 10^{-7} M de ACh (figura 1 C). Así, el comportamiento de la liberación de Ca^{2+} en las células acinares pancreáticas manifestó ser dependiente de la dosis del agonista aplicado. En la tabla I están reflejadas las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ (en nM) de las células acinares pancreáticas en respuesta a la estimulación con diferentes dosis de ACh.

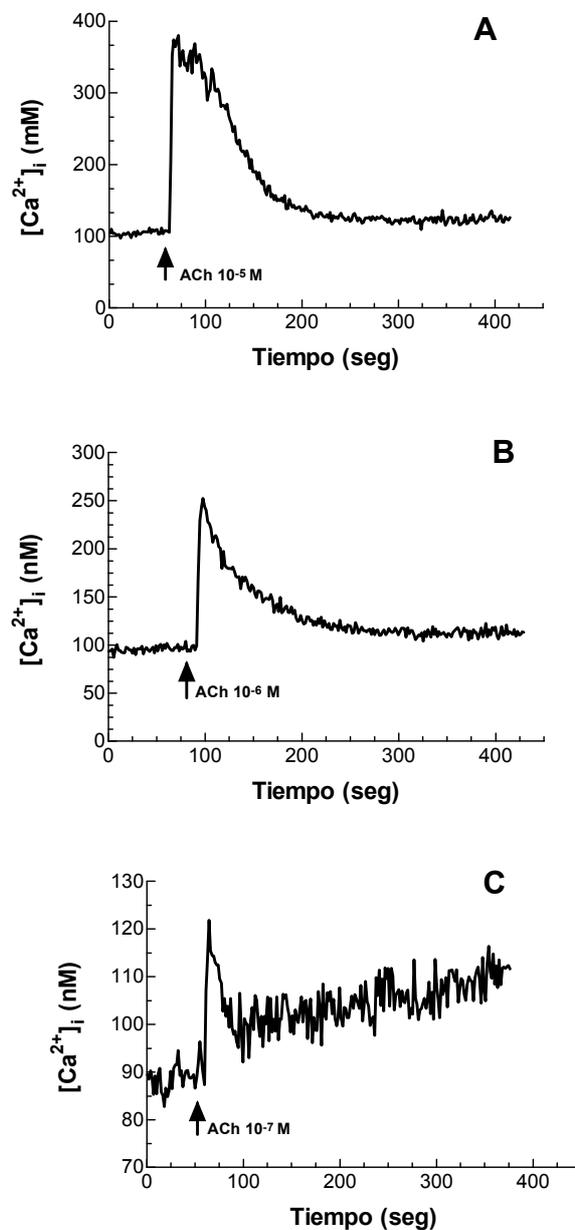


Figura 1. Registros originales en los que se muestran los cambios producidos en la $[Ca^{2+}]_i$ en acinos pancreáticos de rata tras su estimulación con ACh 10^{-5} M (A), 10^{-6} M (B) y 10^{-7} M (C).

La estimulación de las células acinares pancreáticas con CCK-8 a la dosis de 10^{-8} M produjo un patrón de respuesta en la $[Ca^{2+}]_i$ similar al inducido por la estimulación con ACh (a la mayor dosis ensayada) como se puede observar en la figura 2.

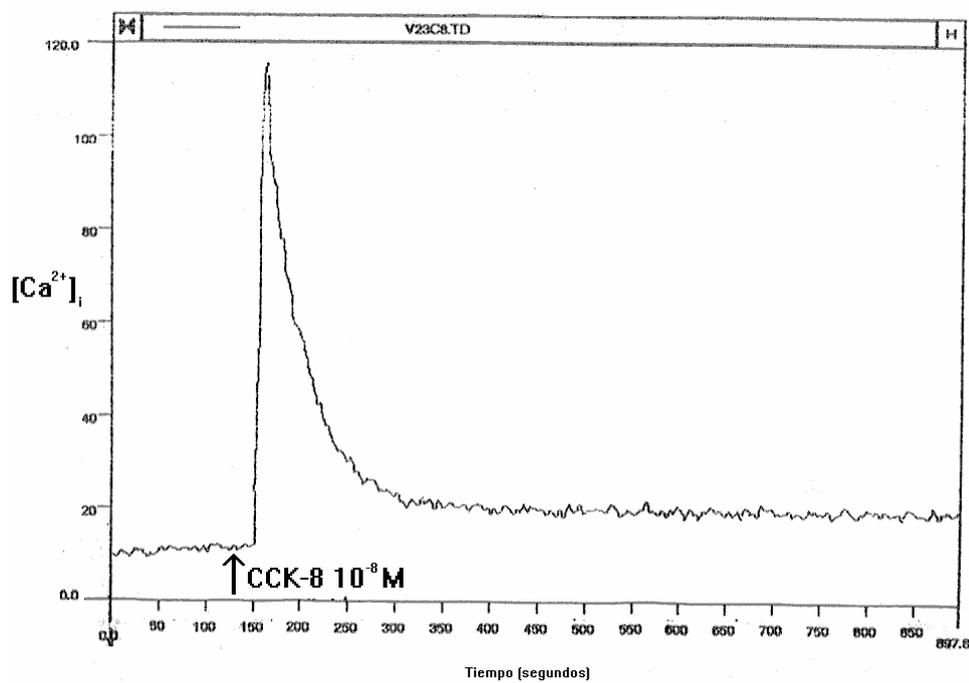


Figura 2. Registro típico que muestra la respuesta producida en la $[Ca^{2+}]_i$ tras la estimulación de las suspensiones acinares con CCK-8 10^{-8} M.

t	ACh 10^{-5} M	ACh 10^{-6} M	ACh 10^{-7} M
Basal	97,56 ± 7,29	87,66 ± 2,73	85,88 ± 4,82
Estímulo	326,76 ± 25,95	203, ± 25,23	109,47 ± 12,90
200 s	284,09 ± 21,54	170,86 ± 19,32	94,65 ± 7,71
300 s	241,64 ± 16,88	147,62 ± 13,14	90,91 ± 6,96
400 s	206,43 ± 13,45	127,32 ± 6,70	91,41 ± 7,72
500 s	139,71 ± 13,19	110,13 ± 4,62	103,51 ± 10,81
n	6	5	5

Tabla I. Variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en respuesta a la estimulación con ACh a las dosis de 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M. Los estímulos eran añadidos directamente a la cubeta a las concentraciones requeridas. Los resultados se expresan como la media más el error estándar de la media.

En el caso de la estimulación con la dosis más baja ensayada de ACh (10^{-7} M) el valor estable de $[Ca^{2+}]_i$ o meseta se alcanzó más rápidamente que a las dosis superiores.

4.1.2.- Efecto de la histamina sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

Dado que se ha descrito que la estimulación de diversos tipos celulares con histamina conduce a un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, nosotros tratamos de averiguar si sus efectos secretagogos, comprobados por otros autores, sobre el páncreas exocrino también estaban mediados por la movilización de este mensajero intracelular.

En nuestras condiciones experimentales, la estimulación con histamina no produjo incrementos significativos en la $[Ca^{2+}]_i$ a ninguna de las dosis ensayadas.

En la tabla II se muestran los valores de la $[Ca^{2+}]_i$ tras la estimulación de las células acinares pancreáticas con dosis de 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M de histamina, y sus variaciones en el período posterior a la adición del estímulo a la cubeta.

t	Hist. 10^{-5} M	Hist. 10^{-6} M	Hist. 10^{-7} M
Basal	94,51±9,21	91,45 ± 4,39	87,67 ± 7,71
Estímulo	95,56 ± 9,35	89,61 ± 2,06	92,71 ± 7,25
200 s	97,86 ± 9,94	89,71 ± 2,54	92,63 ± 7,41
300 s	98,06 ± 9,75	91,68 ± 3,55	91,17 ± 8,13
400 s	99,36 ± 10,31	93,10 ± 3,74	92,30 ± 8,30
500 s	116,87 ± 15,23	121,40 ± 23,08	98,98 ± 11,74
n	7	6	5

Tabla II. Variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en respuesta a la estimulación con histamina a las dosis de 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M. Los estímulos eran añadidos directamente a la cubeta a las concentraciones requeridas. Los resultados se expresan como la media más el error estándar de la media.

4.1.3.- Efectos de los agonistas de los receptores de la histamina sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

En el páncreas exocrino se ha descrito la presencia de tres tipos de receptores diferentes para la histamina. Por ello, decidimos evaluar si la estimulación por separado de los mismos, podría revelar algún cambio en la $[Ca^{2+}]_i$, ya que se ha visto, en otras preparaciones, que la estimulación de uno u otro tipo de receptor está comunicada con vías de mensajeros intracelulares distintos.

Se ensayaron tres agonistas diferentes, uno para cada tipo de receptor: 2-PEA (H1), dimaprit (H2) y α -metilhistamina (H3), y ninguno de ellos indujo variaciones detectables en la $[Ca^{2+}]_i$. Estos agentes se ensayaron a las dosis de $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$, las mismas que las empleadas para el caso de la ACh y la histamina.

En las tablas III, IV y V se muestran los valores de la $[Ca^{2+}]_i$ a lo largo del tiempo, tras la adición de los diferentes agonistas a las suspensiones de células acinares pancreáticas.

t	2-PEA. 10^{-5} M	2-PEA. 10^{-6} M	2-PEA. 10^{-7} M
Basal	99,89 ± 8,87	98,28 ± 6,23	93,01 ± 6,85
Estímulo	101,92 ± 9,74	96,65 ± 6,10	91,63 ± 7,51
200 s	103,15 ± 9,70	97,49 ± 6,38	93,21 ± 7,46
300 s	104,96 ± 9,84	99,50 ± 6,13	93,98 ± 7,51
400 s	106,84 ± 10,50	101,85 ± 6,73	95,79 ± 7,74
500 s	127,59 ± 14,66	125,86 ± 15,09	107,54 ± 10,34
n	6	8	7

Tabla III. Variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en respuesta a la estimulación con 2-PEA a las dosis de 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M. Los estímulos eran añadidos directamente a la cubeta a las concentraciones requeridas. Los resultados se expresan como la media más el error estándar de la media.

A pesar de que ni la histamina ni sus agonistas específicos eran capaces de provocar variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$, decidimos comprobar si eran capaces de producir variaciones en la movilización de Ca^{2+} producidas por la ACh.

t	Dimap. 10^{-5} M	Dimap. 10^{-6} M	Dimap. 10^{-7} M
Basal	97,36 ± 6,75	96,43 ± 6,11	89,85 ± 8,98
Estímulo	96,60 ± 6,72	94,60 ± 4,75	91,59 ± 9,33
200 s	98,53 ± 8,26	95,72 ± 5,23	90,61 ± 9,55
300 s	99,57 ± 7,39	96,73 ± 5,73	91,41 ± 10,08
400 s	100,26 ± 7,72	97,61 ± 6,20	92,61 ± 10,30
500 s	116,67 ± 11,49	108,04 ± 7,57	107,30 ± 13,36
n	5	6	6

Tabla IV. Variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en respuesta a la estimulación con dimaprit a las dosis de 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M. Los estímulos eran añadidos directamente a la cubeta a las concentraciones requeridas. Los resultados se expresan como la media más el error estándar de la media.

t	α -mHist. 10^{-5} M	α -mHist. 10^{-6} M	α -mHist. 10^{-7} M
Basal	87,06 \pm 21,23	98,64 \pm 12,42	91,99 \pm 17,75
Estímulo	90,16 \pm 21,87	93,68 \pm 9,76	90,39 \pm 17,71
200 s	89,56 \pm 21,90	94,80 \pm 9,63	92,20 \pm 19,76
300 s	89,31 \pm 21,72	97,66 \pm 11,66	93,68 \pm 20,16
400 s	92,29 \pm 23,25	98,89 \pm 11,64	96,72 \pm 20,22
500 s	106,64 \pm 27,77	107,78 \pm 15,31	108,57 \pm 26,30
n	5	5	5

Tabla V. Variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en respuesta a la estimulación con α -metilhistamina a las dosis de 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M. Los estímulos eran añadidos directamente a la cubeta a las concentraciones requeridas. Los resultados se expresan como la media más el error estándar de la media.

En ningún caso, la movilización de Ca^{2+} en respuesta a la administración de ACh se vio afectada por la presencia previa de histamina o de los agonistas de sus receptores. En la figura 3 se representa, como ejemplo demostrativo, la respuesta producida por la adición de 10^{-5}M de ACh a la suspensión de células acinares pancreáticas, a las que se les había administrado previamente histamina 10^{-5}M .

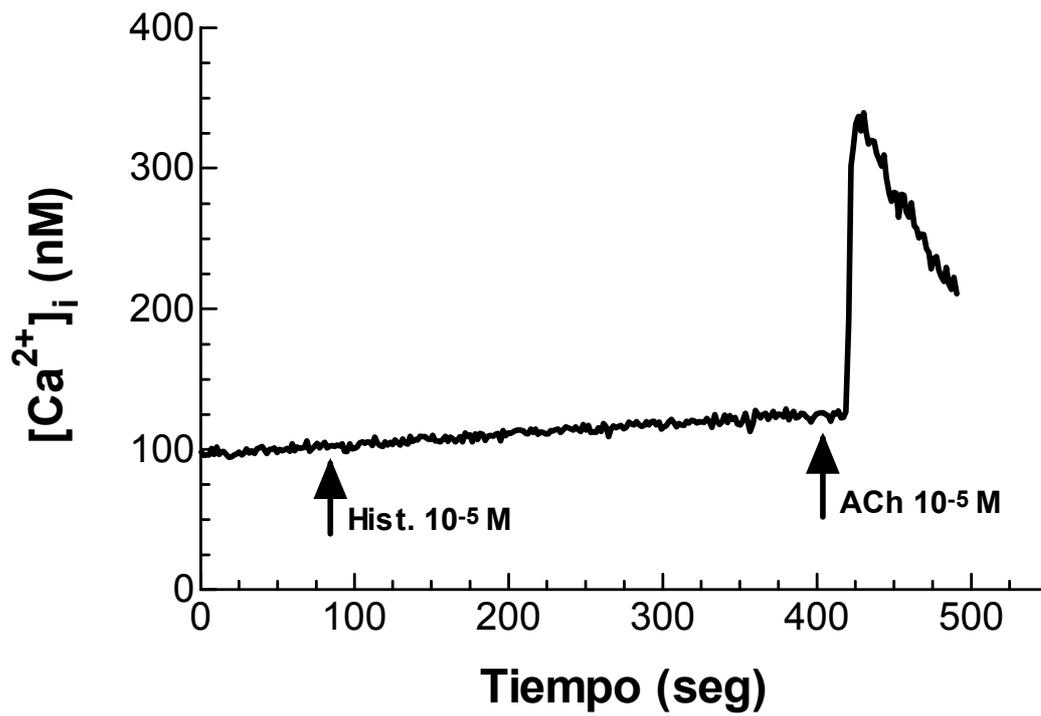


Figura 3. Ejemplo representativo del efecto observado en la respuesta de las células acinares pancreáticas a la adición de 10^{-5} M de ACh, a las que se les había administrado previamente histamina 10^{-5} M.

4.2- Determinación de la $[Mg^{2+}]_i$ en suspensiones acinares.

4.2.1.- Efectos de la CCK-8 y la ACh sobre la $[Mg^{2+}]_i$.

La $[Mg^{2+}]_i$ en las células acinares pancreáticas en reposo fue de $0'75 \pm 0'02$ mM (n=21) cuando el medio en que se encontraban contenía Mg^{2+} (1 mM) y de $0'77 \pm 0'02$ mM (n=14) en medio nominalmente libre de Mg^{2+} .

La estimulación de las células acinares pancreáticas con CCK-8, a la dosis de 10^{-8} M, y ACh, a la dosis de 10^{-5} M, tuvo como resultado un rápido y marcado incremento en la $[Mg^{2+}]_i$ alcanzando un valor máximo aproximadamente a los 20-30 segundos de la estimulación. Este valor resultó ser de $0'98 \pm 0'03$ mM (n=10) para la CCK-8, y de $0'82 \pm 0'05$ mM (n=5) para la estimulación con ACh, siendo significativas estas diferencias con respecto al valor basal de ($P < 0'05$).

El incremento producido en la $[Mg^{2+}]_i$ tras la estimulación de la suspensión celular, se vio seguido de una disminución progresiva hasta lograr un valor estable incluso por debajo del basal, situación que se alcanzaba a los 4-5 minutos de la estimulación. Los valores de la $[Mg^{2+}]_i$ a este tiempo resultaron ser de $0'59 \pm 0'02$ mM (n=10) y $0'59 \pm 0'05$ mM (n=5) para la CCK-8 y la ACh, respectivamente. Esta disminución de la $[Mg^{2+}]_i$ por debajo del basal sólo fue estadísticamente significativa en el caso de la CCK-8 10^{-8} M ($P < 0'05$).

En la figura 4 están representados trazos típicos que describen las variaciones observadas en la $[Mg^{2+}]_i$ ante la estimulación de las células acinares pancreáticas con estos secretagogos. La $[Mg^{2+}]_i$ en diferentes momentos tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 10^{-8} M, ACh 10^{-5} M e histamina 10^{-4} M está representada en el conjunto de histogramas que muestra la figura 5.

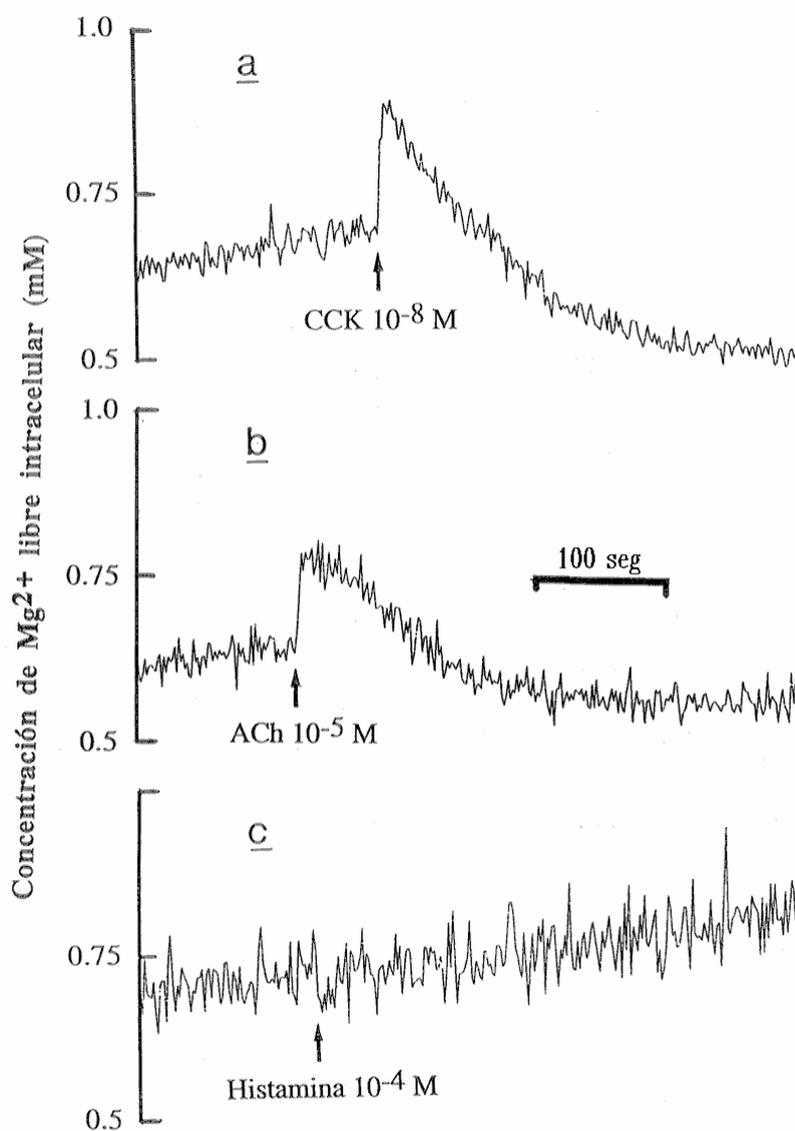


Figura 4. Registros originales en los que se muestran los cambios producidos en la $[Mg^{2+}]_i$ en acinos pancreáticos de rata tras su estimulación con CCK-8 $10^{-8}M$ (a), ACh $10^{-5}M$ (b) e histamina $10^{-4}M$ (c) en un medio KRH conteniendo 1 mM de Mg^{2+} .

Ya que la CCK-8 y la ACh eran capaces de inducir la movilización de Mg^{2+} cuando las células acinares pancreáticas estaban en presencia de este ion en el medio extracelular, parecía interesante evaluar si la ausencia de Mg^{2+} en el medio podría alterar las respuestas a estos secretagogos.

En la figura 6 están representados los registros originales que la estimulación con $10^{-8}M$ de CCK-8 y $10^{-5}M$ de ACh presentaban sobre la $[Mg^{2+}]_i$ en un medio nominalmente libre de Mg^{2+} . Tanto la CCK-8 como la ACh eran capaces de inducir incrementos en la $[Mg^{2+}]_i$ por encima del valor basal de manera similar a como sucedía en condiciones normales; los valores máximos de $[Mg^{2+}]_i$ alcanzados fueron de 0.96 ± 0.03 mM (n=5) para la CCK-8 y 0.87 ± 0.03 mM (n=5) para la ACh. Estos valores no presentaban diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon con los valores alcanzados cuando las células se estimulaban en presencia de 1 mM de Mg^{2+} en el medio extracelular.

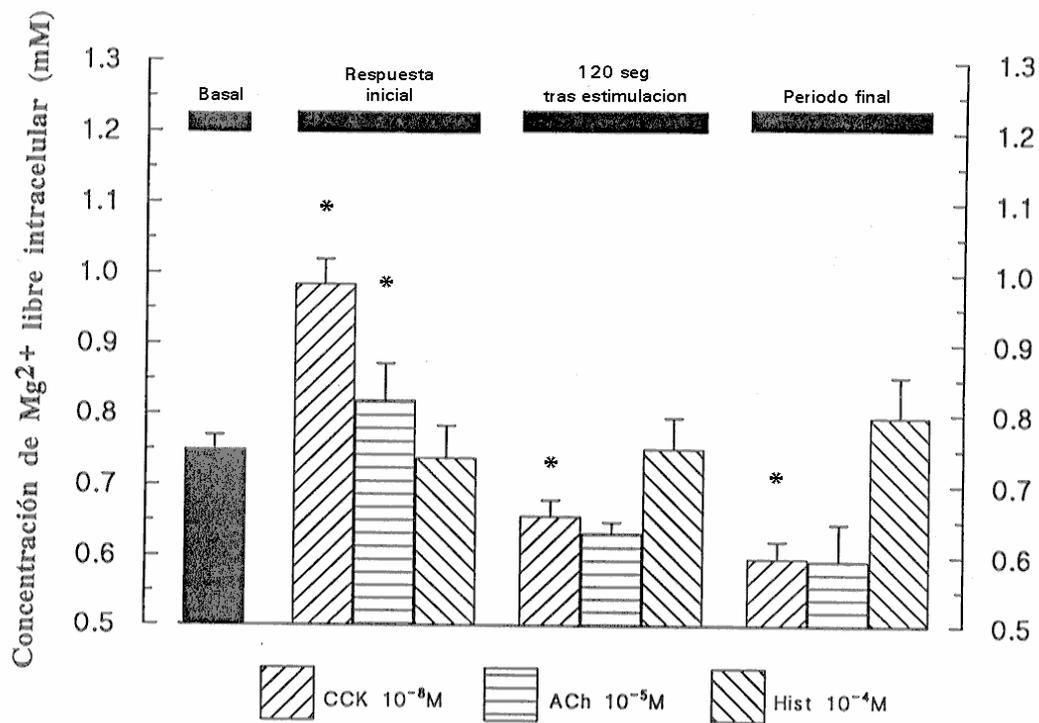


Figura 5. Conjunto de histogramas que muestran la $[Mg^{2+}]_i$ en diferentes momentos tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 $10^{-8}M$, ACh $10^{-5}M$ e histamina $10^{-4}M$ en un medio KRH conteniendo 1 mM de Mg^{2+} . Los resultados se expresan como la media \pm EEM (* $p < 0.05$ con respecto al basal; $n=6$).

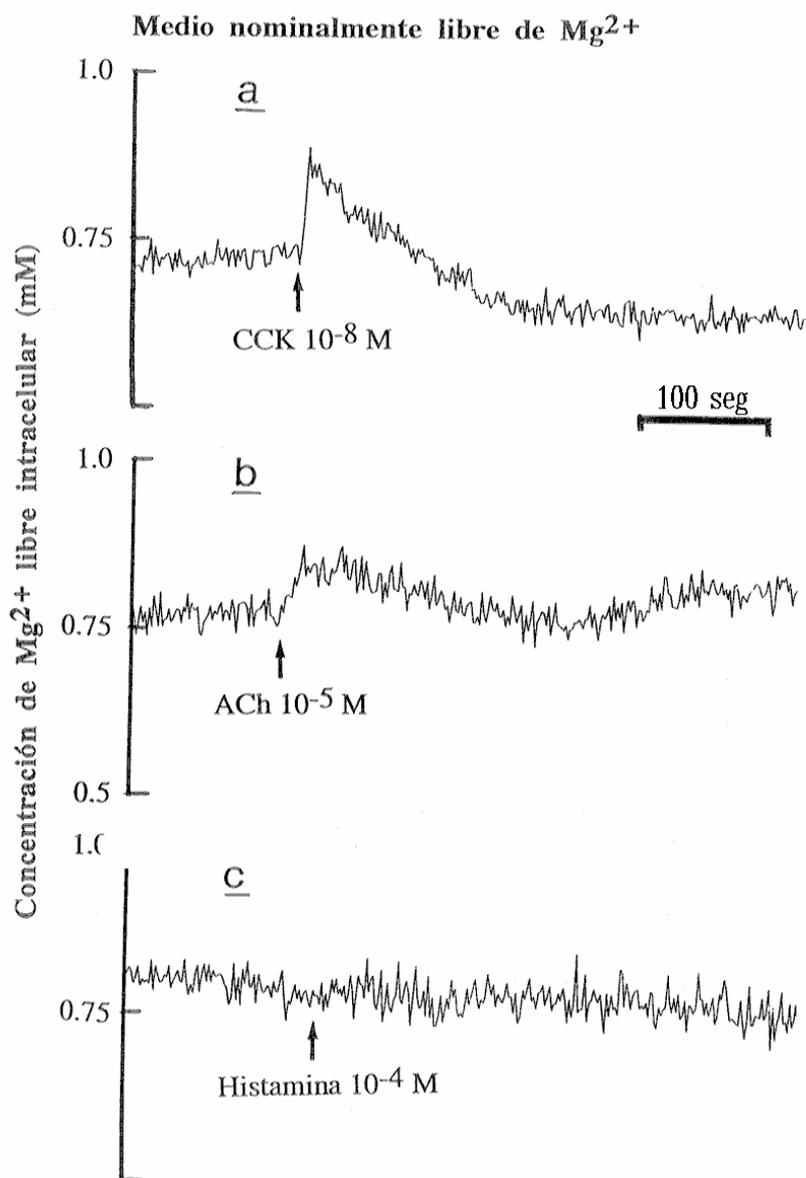


Figura 6. Registros originales en los que se muestran los cambios producidos en la $[Mg^{2+}]_i$ en acinos pancreáticos de rata tras su estimulación con CCK-8 10^{-8} M (a), ACh 10^{-5} M (b) e histamina 10^{-4} M (c) en un medio KRH nominalmente libre de Mg^{2+} .

El aumento en la $[Mg^{2+}]_i$ se vio acompañado por una posterior disminución por debajo del basal alcanzando valores de $0'72 \pm 0'06$ mM (n=5) y $0'80 \pm 0'03$ (n=5) para la CCK-8 y ACh respectivamente.

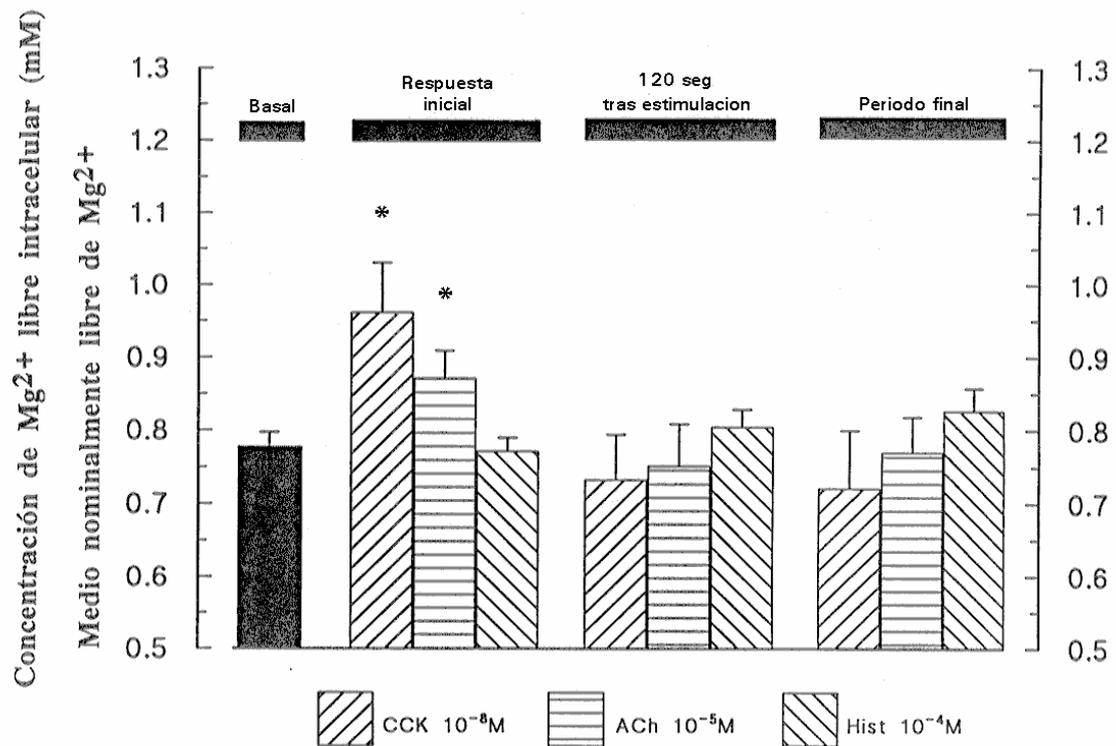


Figura 7. Conjunto de histogramas que muestran la $[Mg^{2+}]_i$ en diferentes momentos tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 $10^{-8}M$, ACh $10^{-5}M$ e histamina $10^{-4}M$ en un medio KRH nominalmente libre de Mg^{2+} . Los resultados se expresan como la media \pm EEM (* $p < 0.05$ con respecto al basal; $n=5$).

Nuevamente, las diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas con respecto a la estimulación en medio con 1 mM de Mg^{2+} . En la figura 7 se muestran histogramas que representan la $[Mg^{2+}]_i$ en diferentes momentos tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 $10^{-8}M$, ACh $10^{-5}M$ e histamina $10^{-4}M$.

En la figura 8 se muestra el efecto de la estimulación con CCK-8 $10^{-8}M$ sobre la $[Mg^{2+}]_i$ tras la adición previa de ACh $10^{-5}M$ a las suspensiones de células acinares pancreáticas. Como se puede observar, el ion Mg^{2+} parece ser movilizado por ambos agentes secretagogos desde el mismo depósito intracelular, ya que la estimulación con CCK-8 no se siguió de un nuevo incremento en la $[Mg^{2+}]_i$ tras una primera estimulación con ACh.

4.2.2.- Efecto de la histamina sobre la $[Mg^{2+}]_i$.

La estimulación con histamina a la dosis de $10^{-4}M$ no tuvo efectos significativos sobre la $[Mg^{2+}]_i$ (0.78 ± 0.03 mM; n=6). La respuesta de las células acinares pancreáticas en presencia de histamina está representada en la figura 4.

El valor de la $[Mg^{2+}]_i$ permanecía invariable (0.79 ± 0.06 mM; n=6) a lo largo del tiempo tras la adición de este agente a la cubeta, no observándose la disminución por debajo del basal que se producía después de la estimulación de las células con CCK-8 y/o ACh.

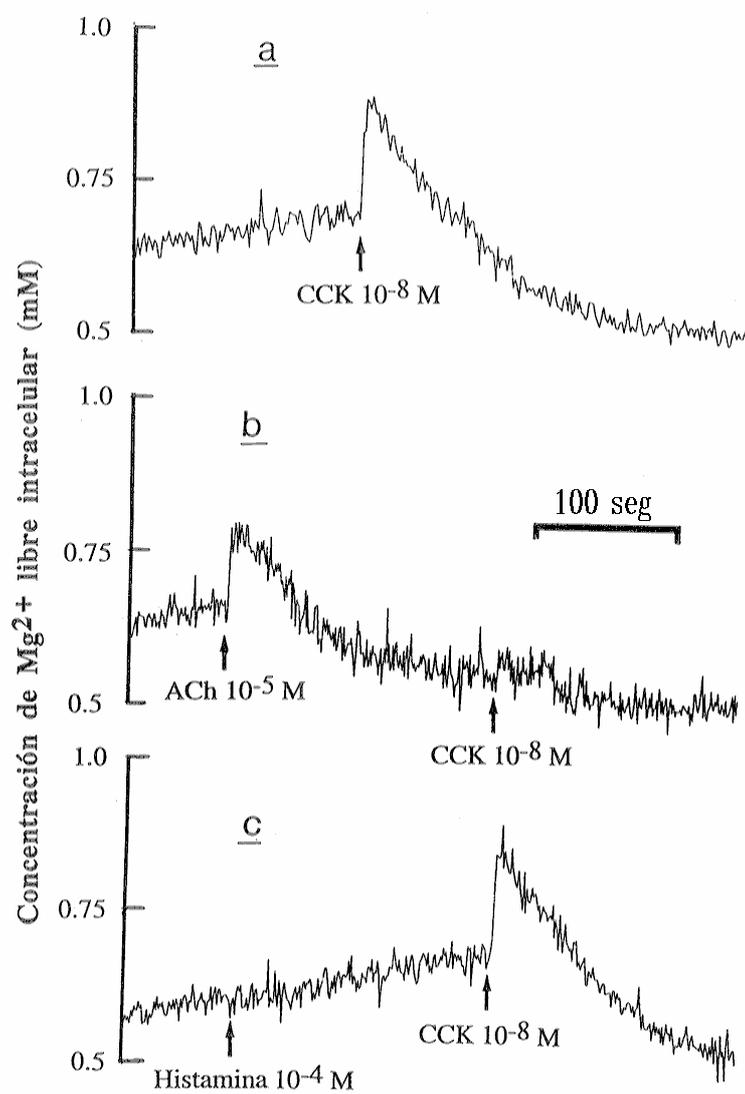


Figura 8. Efecto de la estimulación con CCK-8 10^{-8} M (a) sobre la $[Mg^{2+}]_i$ tras la adición previa de ACh 10^{-5} M (b) e histamina 10^{-4} M (c) a las suspensiones de células acinares pancreáticas.

Además, en la figura 8, se puede apreciar cómo la presencia de histamina (c) no afectó a la respuesta inducida por la adición de CCK-8 10^{-8} M a la suspensión celular. El valor de la $[Mg^{2+}]_i$ alcanzado en esta situación fue de $0'88 \pm 0'05$ mM (n=5) que no resultó ser estadísticamente diferente del los valores de $[Mg^{2+}]_i$ obtenidos con CCK-8 sola ($0'98 \pm 0'03$; n=10).

En los experimentos realizados en ausencia de Mg^{2+} en el medio extracelular, la estimulación con 10^{-4} M de histamina mantuvo su aparente ausencia de efecto sobre la movilización de Mg^{2+} como se observa en la figura 6.

4.2.3.- Efectos de la CCK-8 y la ACh sobre la $[Mg^{2+}]_o$.

Cuando se empleó la sal tetrapotasio de mag-fura-2 para determinar las variaciones producidas en la $[Mg^{2+}]_o$ se encontraron valores de reposo de $1'03 \pm 0'04$ mM (n=14) en medio con 1 mM nominal de Mg^{2+} y $0'05 \pm 0'02$ mM (n=13) en medio nominalmente libre de Mg^{2+} .

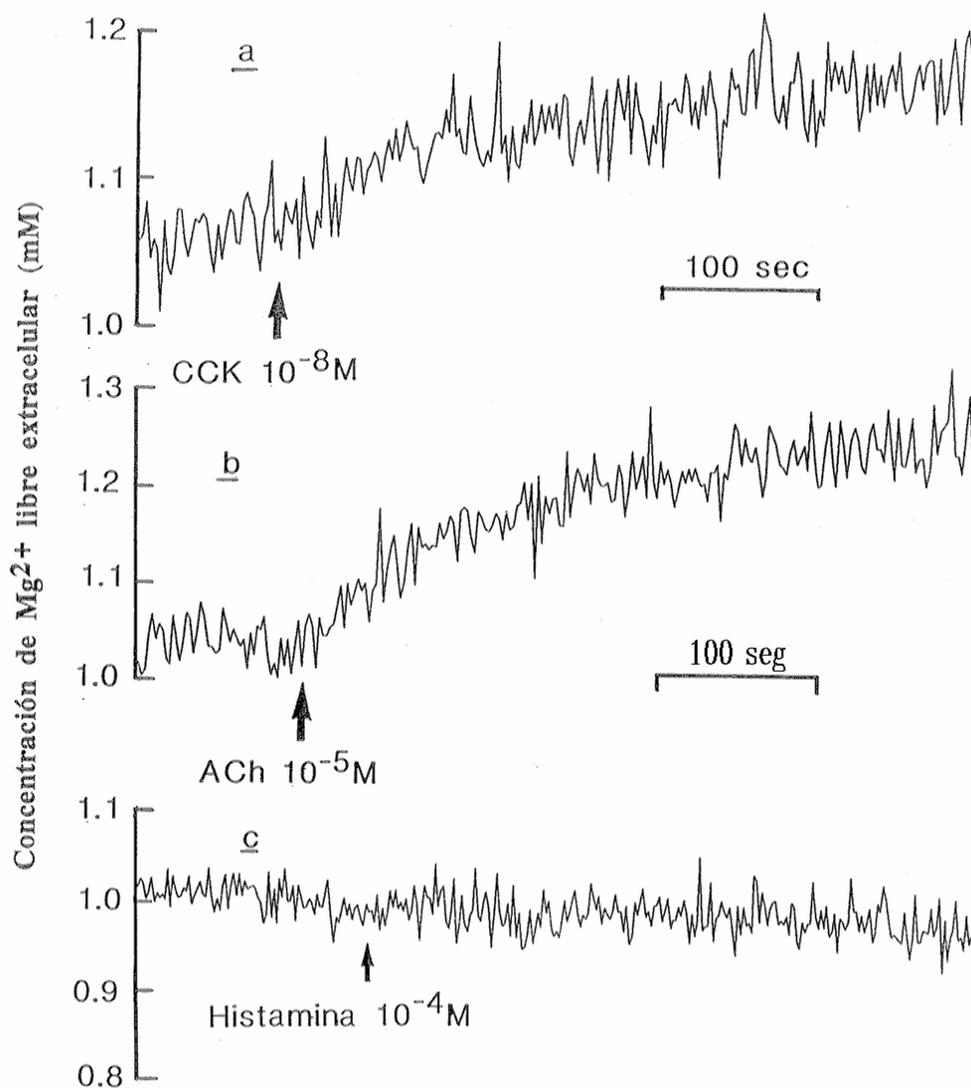


Figura 9. Registros de la $[Mg^{2+}]_o$ en experimentos realizados con la sal tetrapotasio de mag-fura-2 ($2.5 \mu M$) en presencia de Mg^{2+} 1 mM en el medio extracelular. La suspensiones acinares se estimularon con CCK-8 $10^{-8} M$ (a), ACh $10^{-5} M$ (b) e histamina $10^{-4} M$ (c).

En la figura 9 se muestran los registros de la $[Mg^{2+}]_o$ en los experimentos realizados con la sal tetrapotasio de mag-fura-2. La suspensiones acinares se estimularon con CCK-8 y ACh a las dosis de $10^{-8}M$ y $10^{-5}M$ respectivamente. Su adición a la cubeta se siguió de una gradual salida de Mg^{2+} al medio extracelular, alcanzando un valor estable al cabo de 300-350 segundos de la estimulación. Desde los valores de reposo la $[Mg^{2+}]_o$ aumentó hasta $1'15 \pm 0'05$ mM (n=5) y $1'18 \pm 0,06$ (n=5) respectivamente tras la estimulación con CCK-8 10^{-8} M y ACh $10^{-5}M$. Estos incrementos no fueron estadísticamente significativos comparados con el basal. En la figura 10 están representados histogramas que muestran la $[Mg^{2+}]_i$ en diferentes momentos (120 s. y 300 s.) tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 $10^{-8}M$, ACh $10^{-5}M$ e histamina $10^{-4}M$ en medio KRH conteniendo 1 mM de Mg^{2+} . Los resultados se expresan en valor absoluto como incrementos de la $[Mg^{2+}]_i$ sobre el basal.

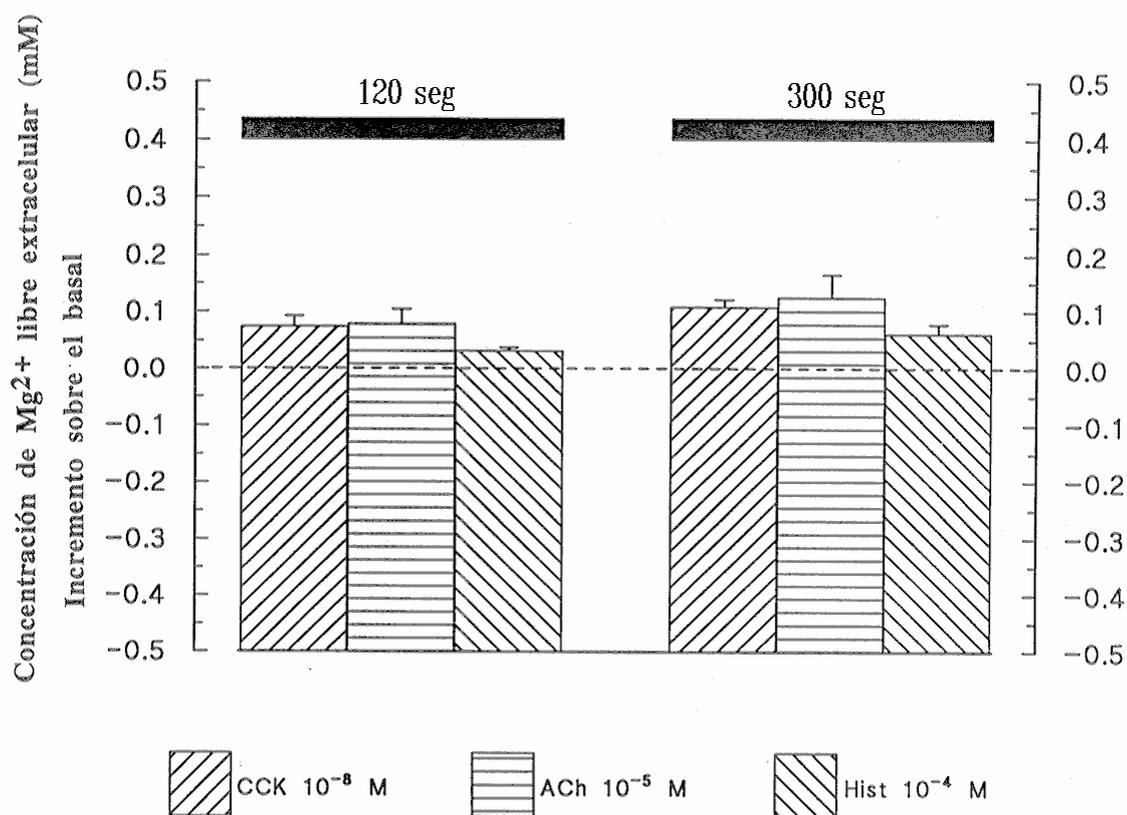


Figura 10. Conjunto de histogramas que muestran la $[Mg^{2+}]_i$ en diferentes momentos (120 s. y 300 s.) tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 $10^{-8}M$, ACh $10^{-5}M$ e histamina $10^{-4}M$ en medio KRH conteniendo 1 mM de Mg^{2+} . Los resultados representan la media en valor absoluto como incrementos sobre el basal \pm EEM de $[Mg^{2+}]_i$ (n=5).

La monitorización de los movimientos de salida de Mg^{2+} en medio nominalmente libre de dicho ion reveló que, tras la estimulación de las suspensiones acinares con $10^{-8}M$ de CCK-8 y $10^{-5}M$ de ACh, se producía un incremento en la $[Mg^{2+}]_o$ que alcanzaba un valor estable, al cabo de 300-350 segundos, de $0'16 \pm 0'06$ mM (n=5) para la estimulación con CCK-8 y $0'20 \pm 0'06$ mM (n=5) para el caso de la estimulación con ACh, sobre el valor basal. En la figura 11 se puede apreciar el incremento producido en la $[Mg^{2+}]_o$ tras la adición de estos agentes a la cubeta, incrementos que no fueron estadísticamente diferentes de los obtenidos en medio conteniendo 1 mM de Mg^{2+} . En la figura 12 está representado un conjunto de histogramas que muestran la $[Mg^{2+}]_i$ en diferentes momentos (120 s. y 300 s.) tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 $10^{-8}M$, ACh $10^{-5}M$ e histamina $10^{-4}M$ en medio KRH nominalmente libre de Mg^{2+} . Los resultados se expresan en valor absoluto como incrementos de la $[Mg^{2+}]_i$ sobre el basal.

4.2.4.- Efecto de la histamina sobre la $[Mg^{2+}]_o$.

En las figuras 9 y 11 se representan los registros obtenidos tras la adición de $10^{-4}M$ de histamina a suspensiones de células acinares pancreáticas en medio que contenía 1 mM de Mg^{2+} (figura 9) y en otro nominalmente libre de Mg^{2+} (figura 11). En ningún caso se observó que la histamina provocara movimientos de Mg^{2+} hacia el medio extracelular.

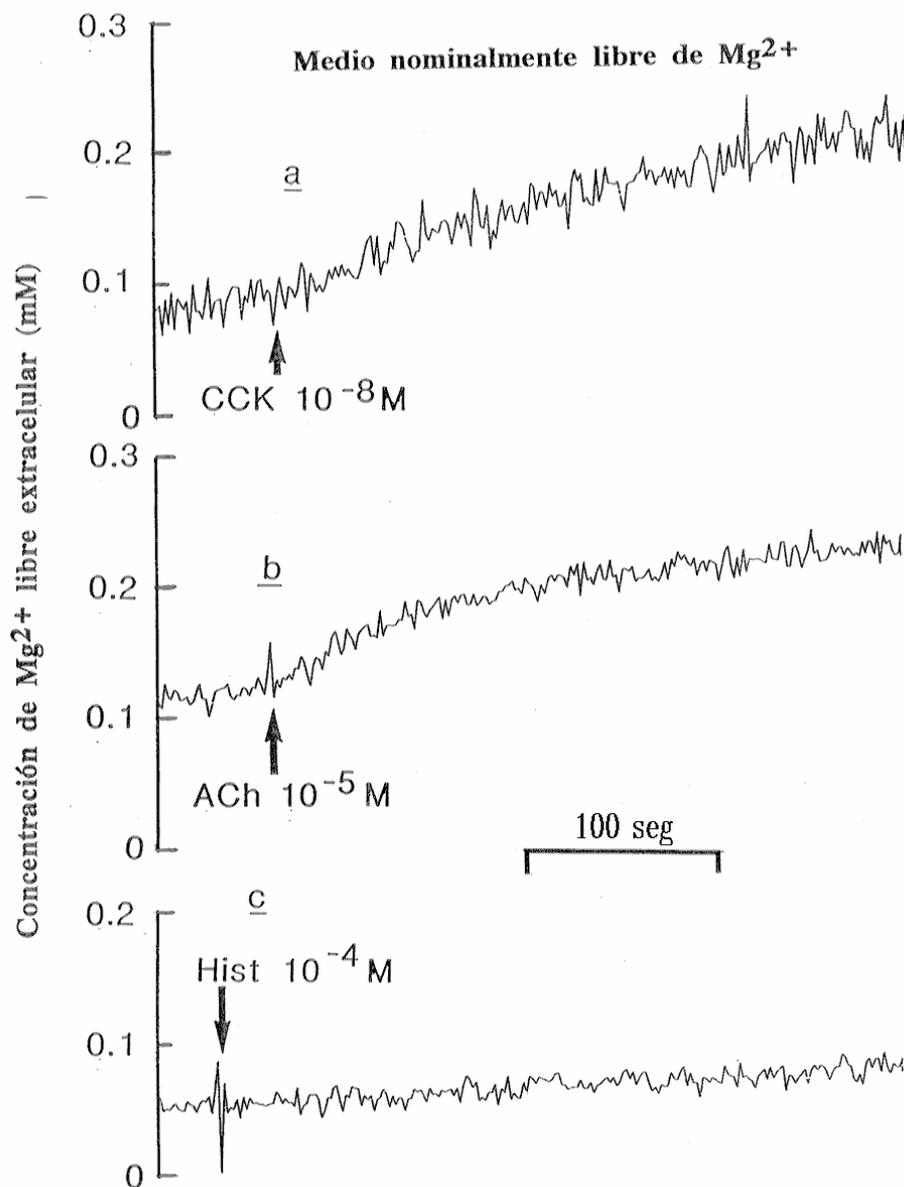


Figura 11. Registros de la $[Mg^{2+}]_o$ en experimentos realizados con la sal tetrapotasio de mag-fura-2 ($2.5 \mu M$) en ausencia de Mg^{2+} en el medio extracelular. Las suspensiones acinares se estimularon con CCK-8 10^{-8} M (a), ACh 10^{-5} M (b) e histamina 10^{-4} M (c).

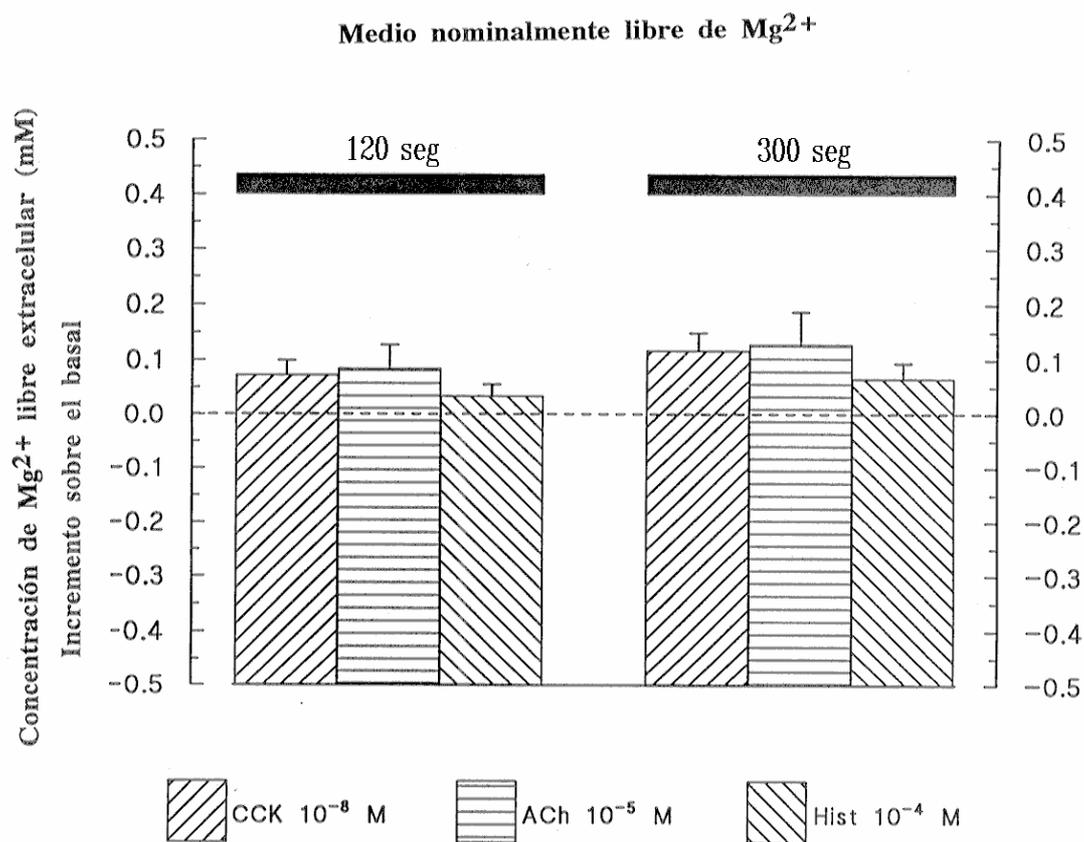


Figura 12. Conjunto de histogramas que muestran la $[Mg^{2+}]_i$ en diferentes momentos (120 s. y 300 s.) tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 10^{-8} M, ACh 10^{-5} M e histamina 10^{-4} M en un medio KRH nominalmente libre de Mg^{2+} . Los resultados representan la media en valor absoluto como incrementos sobre el basal \pm EEM de la $[Mg^{2+}]_i$ (n=5).

Estos resultados parecen indicar que los cambios observados en la $[Mg^{2+}]_i$ no son dependientes de la presencia de Mg^{2+} en el medio extracelular y que la histamina no parece mediar su acción a través de la movilización de Mg^{2+} intracelular.

4.3 Experimentos en células aisladas.

4.3.1.- Efecto de los secretagogos sobre el pH_i .

En la mayoría de las células estudiadas el pH_i en reposo estaba comprendido entre 7 y 7,3, valor semejante al hallado por otros autores en este y otros tipos de células. Cuando se aplicaba a las células una concentración de 10^{-8} M de CCK-8 el pH_i sufría una reducción transitoria (figura 13). Esta acidificación tenía un valor máximo de unas 0,07 unidades de pH, y era estadísticamente significativa ($p < 0,005$) cuando se comparaba esta reducción de pH_i con el valor de reposo. El valor máximo de acidificación se alcanzaba pasados unos 40-70 segundos desde el inicio de la respuesta. El patrón seguido por el pH_i tras la acidificación consistía en una lenta y paulatina alcalinización hacia los valores de reposo, si bien esta recuperación no siempre era completa. En la figura 14 podemos observar el efecto de la estimulación con CCK-8 a la dosis fisiológica de 20 pM. En este caso la acidificación era menor ($p < 0,005$) y aparecía en un porcentaje de células inferior ($\chi^2 = 30,7$; $p < 0,005$) que para el caso de la dosis 10^{-8} M CCK-8, lo que es coincidente con el modo de reclutamiento de las células por esta hormona.

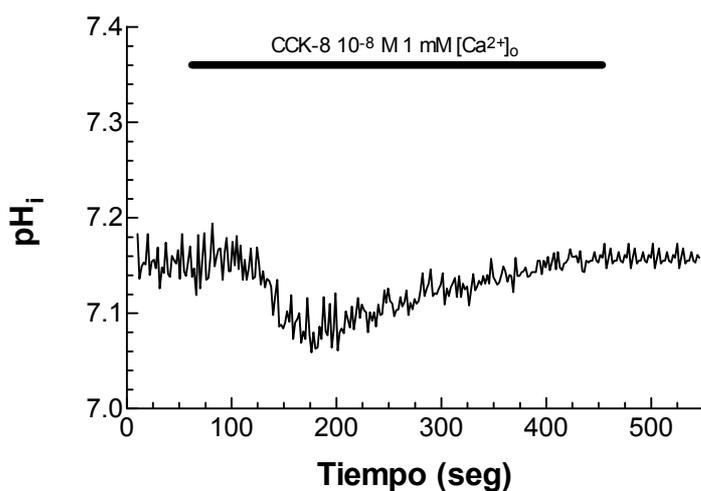


Figura 13. Registros en los que se muestran los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con CCK-8 10^{-8} M en medio conteniendo 1 mM de Ca^{2+} .

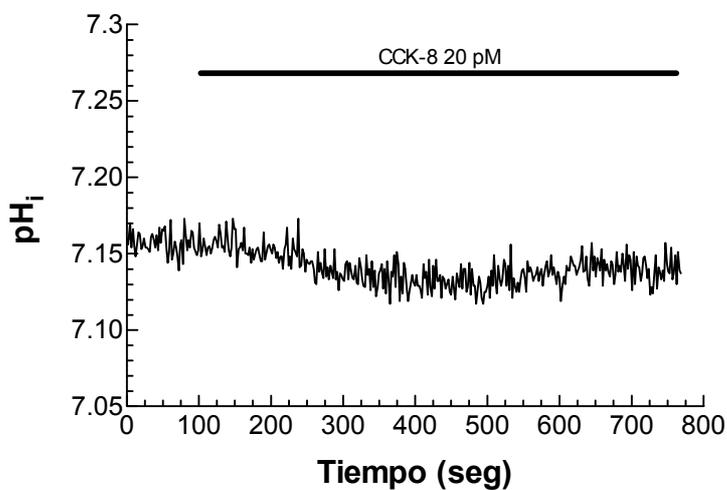


Figura 14. Registro que muestra los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con CCK-8 20 pM en medio conteniendo 1 mM de Ca^{2+} .

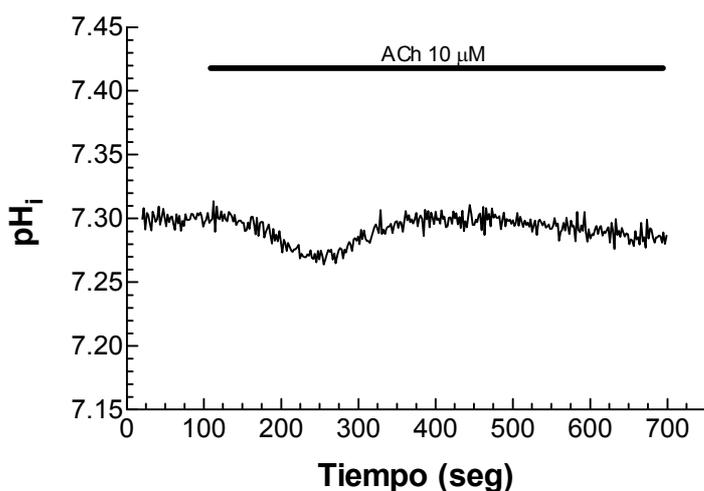


Figura 15. Registro que muestra los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con ACh $10 \mu\text{M}$ en medio conteniendo 1 mM de Ca^{2+} .

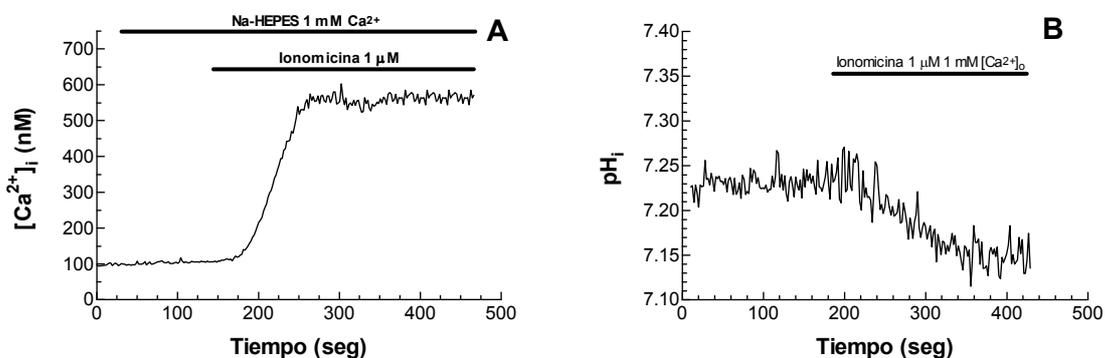


Figura 16. Registro que muestra los cambios producidos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (A) y en el pH_i (B) en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con ionomicina $1 \mu\text{M}$ en medio conteniendo 1 mM de Ca^{2+} . Representativo de 4 experimentos.

Con el fin de comprobar si este efecto sobre el pH_i era exclusivo de la CCK-8 o si por el contrario era compartido con otros secretagogos, realizamos unos experimentos en los que aplicábamos concentraciones máximas (10 μM) y submáximas (100 nM) de ACh. El efecto, como en el caso de la CCK-8 consistía en una fase de acidificación seguida de una alcalinización y resultó ser dependiente de la dosis empleada (figura 15), La acidificación obtenida ante la estimulación con la dosis menor de ACh era reducida tanto en amplitud (no estadísticamente significativa) como en la frecuencia de células que presentaban respuesta (ver tabla VI).

Estímulo	pH _i Basal	Tratamiento	Resp./nº T cél.
CCK-8 10 nM	7'230 ± 0'036	0'0692 ± 0'006	91/98
20 pM	7'321 ± 0'040	0'0332 ± 0'004	39/69
ACh 10 µM	7'535 ± 0'025	0'0412 ± 0'003	59/75
100 nM	7'077 ± 0'034	0'0271 ± 0'004	25/90

Tabla VI. Efecto que la estimulación con diferentes dosis de CCK-8 y ACh presenta sobre el pH_i en las células acinares pancreáticas. Se indica la acidificación producida así como el número de células en que se obtuvo respuesta (***) p<0'005 respecto al basal).

4.3.2.- Papel del Ca^{2+} en la acidificación producida por la CCK-8.

Para determinar si la respuesta de Ca^{2+} que produce la CCK-8 en las células acinares pancreáticas interviene en la acidificación inducida por esta hormona, realizamos una serie de experimentos en los que se elevaba la $[Ca^{2+}]_i$ mediante diferentes procedimientos; de esta manera podríamos determinar si un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ podría acidificar la célula.

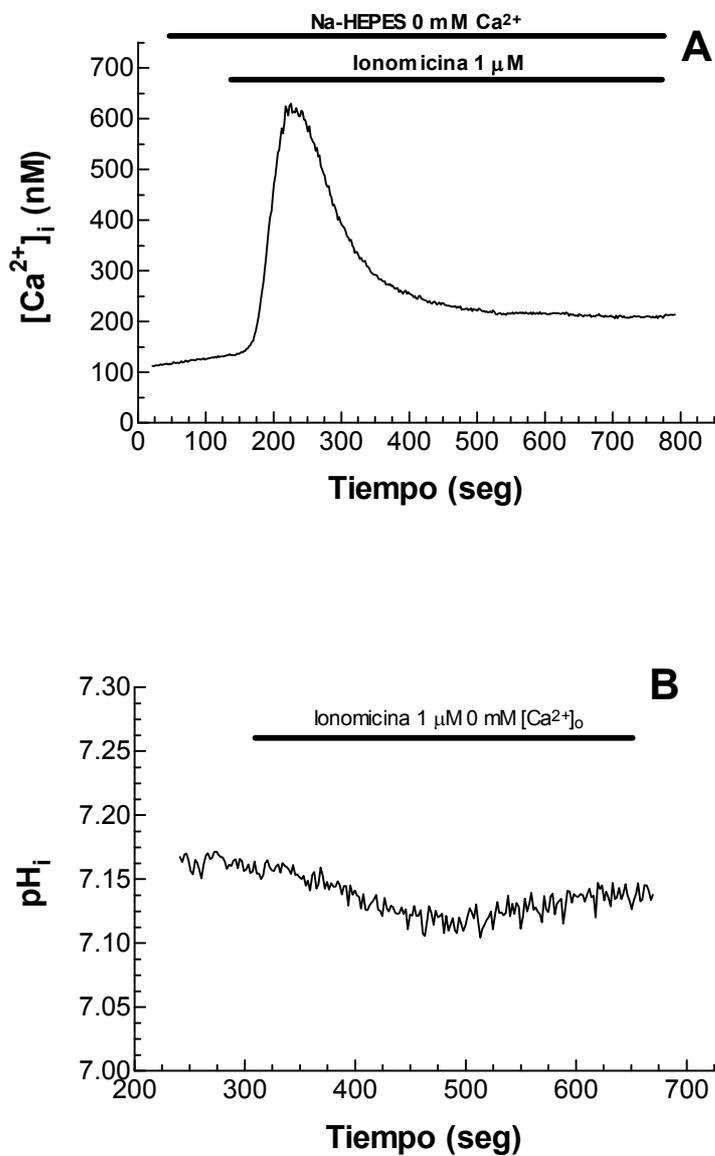


Figura 17. Registro que muestra los cambios producidos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (A) y en el pH_i (B) en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con ionomicina 1 μM en medio libre de Ca^{2+} . Representativo de 3 experimentos.

En la figura 16 se representa el efecto de la ionomicina (1 μM) sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (a) y sobre el pH_i (b). En ambos parámetros este ionóforo produce un aumento en la concentración de iones (Ca^{2+} y H^+), de manera lenta y paulatina. El efecto sobre el pH_i fue más pronunciado en presencia de 1 mM de Ca^{2+} en el medio extracelular que en ausencia del mismo (figura 17b), al igual que sucedía con el incremento observado en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figura 17a) ante el tratamiento con este compuesto.

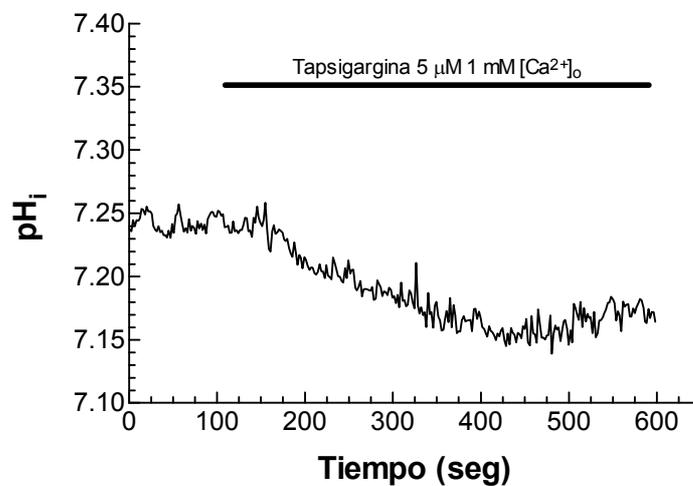


Figura 18. Registro que muestra los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con tapsigargina 5 μM en medio conteniendo 1 mM de Ca^{2+} .

Otra técnica para incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ en el citosol celular es el empleo de inhibidores de la bomba de Ca^{2+} presente en el retículo endoplasmático (Toescu y Petersen, 1995). Su aplicación detiene o reduce la acumulación de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares, con lo que este ion aumenta su concentración en el citoplasma y los depósitos internos quedan finalmente vacíos. Los dos principales compuestos con este efecto son la tapsigargina y el ácido ciclopiazónico (este último no puede utilizarse para determinaciones de pH_i ya que se acumula en la célula y por su naturaleza ácida reduce el pH_i “per se”). La aplicación de tapsigargina (5 μM) produjo una reducción del pH_i de una manera más lenta que en el caso de la CCK-8 (figura 18).

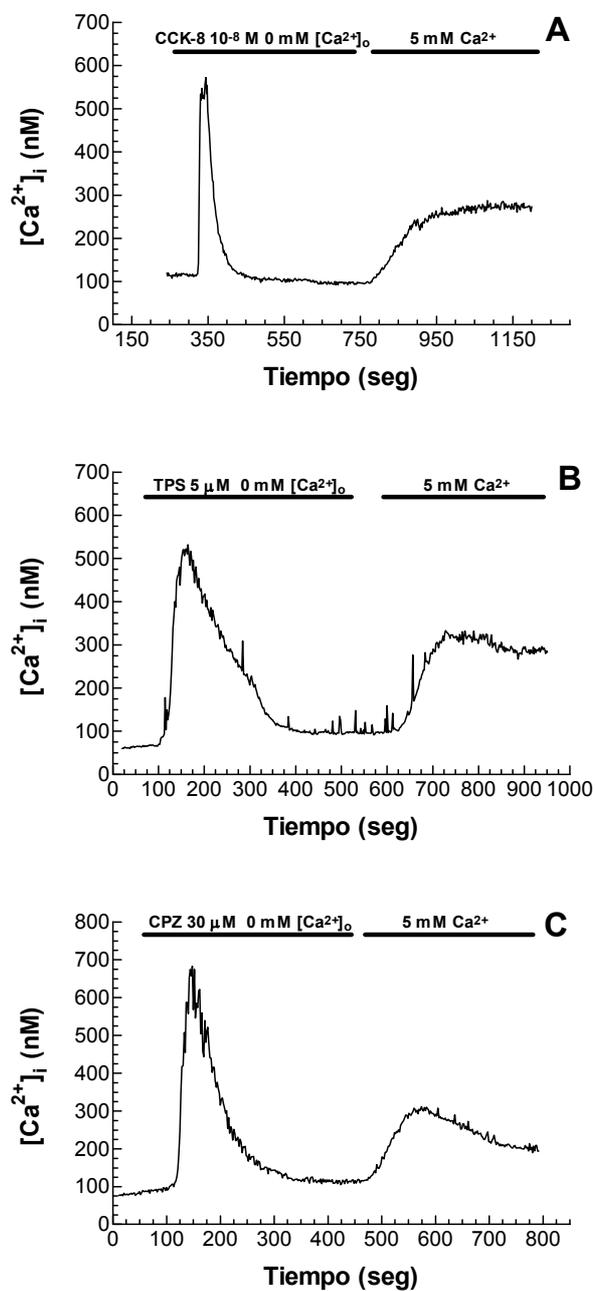


Figura 19. Registros que muestran los cambios producidos la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata en medio libre de Ca^{2+} tras su estimulación con CCK-8 10^{-8} M (A), TPS $5 \mu\text{M}$ (B) y CPZ $30 \mu\text{M}$ (C), así como el efecto que presenta la reposición del ion Ca^{2+} en el medio extracelular.

Finalmente, otro sistema para aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ consiste en inducir la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Al igual que en la mayoría de otros tipos celulares, esto sucede en las células acinares pancreáticas (mediante un mecanismo aún desconocido) cuando los depósitos internos se vacían, bien por el uso de concentraciones altas de agonistas (Muallem y cols., 1989), o bien por inhibidores de la bomba de Ca^{2+} del retículo (Yule y cols., 1994).

Por tanto realizamos experimentos en los que las células se perfundían inicialmente, en medio libre de Ca^{2+} , con CCK-8 10^{-8} M, con taspigargina $5 \mu M$ o con CPZ $30 \mu M$ para vaciar los depósitos. Tras esto, se continuaba la perfusión con 5 mM de Ca^{2+} en el medio. En esta situación experimental el Ca^{2+} extracelular penetra en las células debido a que los almacenes internos han sido vaciados. El incremento observado en la $[Ca^{2+}]_i$ en esta parte del experimento es un índice de entrada de Ca^{2+} extracelular (figura 19). En la figura 20 podemos observar el efecto que presenta este proceso de entrada de Ca^{2+} sobre el pH_i . Cualquiera que sea la técnica utilizada para vaciar los depósitos el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ induce una acidificación celular estadísticamente significativa. En la tabla VII se resume el efecto de la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ mediante los protocolos que acabamos de describir. No se incluye el valor de la acidificación producida por CPZ por deberse, al menos en parte, al carácter ácido del compuesto.

Estímulo	pH _i Basales	ΔpH _i Experimental
Ionom. 1 μM		
1 mM Ca ²⁺	7'198 ± 0'027	0'078 ± 0'008 ***
0 mM Ca ²⁺	7'267 ± 0'057	0'025 ± 0'004
TPS 5 μM	7'240 ± 0'037	0'056 ± 0'004 ***
Influx tras:		
TPS	7'121 ± 0'031	0'030 ± 0'004 ***
CPZ	7'221 ± 0'022	0'036 ± 0'005 ***
CCK-8	7'167 ± 0'038	0'034 ± 0'007 ***

Tabla VII. Efecto que la aplicación de ionomicina y tapsigargina presenta sobre el pH_i en las células acinares pancreáticas, así como el efecto que la entrada de Ca²⁺ presenta sobre el pH_i tras el tratamiento con TPS (5 μM), CPZ (30 μM) y CCK-8 (10 nM). Salvo indicado, los experimentos se realizaron en medio libre de Ca²⁺. Se indica el pH_i basal y la acidificación producida (***) p<0'005 respecto al basal).

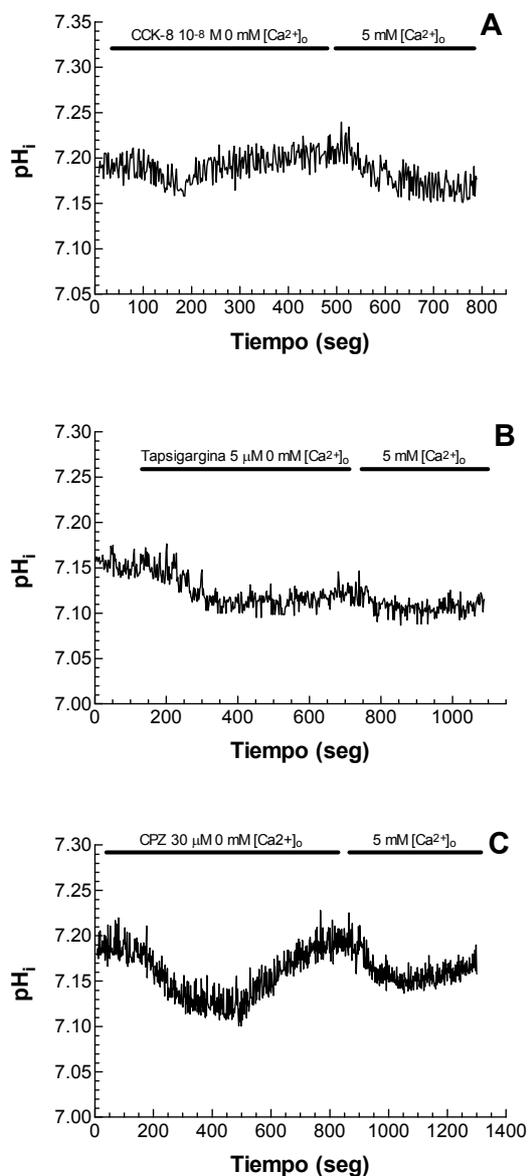


Figura 20. Registros que muestran los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata cuando el medio de perfusión contenía CCK-8 10⁻⁸M (A), tapsigargina 5 μM (B) y ácido ciclopiazónico 30 μM (C) en medio libre de Ca²⁺, seguido de un medio que contenía 5 mM de Ca²⁺ (representativos de 3 experimentos).

Por otra parte, está bien documentado que tanto la CCK-8 como la ACh, inducen un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediante dos mecanismos: inicialmente liberan el Ca^{2+} que está acumulado en los depósitos intracelulares, y a continuación se activa la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo. Para comprobar si alguna de estas fases está asociada a la acidificación citosólica observada, diseñamos protocolos en los que cada una de ellas se modifica selectivamente.

La estimulación de las células con CCK-8 $10^{-8}M$ en un medio libre de Ca^{2+} produce una respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ similar a la control en su porción inicial (figura 21 a), si bien la fase sostenida de la respuesta resulta ser ligeramente inferior (figura 21 b), debido a que esta fase depende de la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular.

En esta misma situación el pH_i también se reduce de manera transitoria (figura 22), siendo el valor de esta acidificación ($0'040 \pm 0'004$, 77 de 98 células estudiadas) ($p < 0'005$) menor que en los experimentos control ($0'069 \pm 0'006$, 91 de 98 células estudiadas), lo que indica que si bien el Ca^{2+} extracelular no es indispensable para la respuesta de pH_i a la CCK-8, contribuye en cierta medida a su aparición.

Por otra parte, la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos, que es responsable del aumento rápido e inicial de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la CCK-8, puede abolirse mediante el vaciado previo de los depósitos utilizando tapsigargina o ácido ciclopiazónico. En la figura 23 se muestra cómo, en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular, la aplicación secuencial de tapsigargina $10 \mu M$ (a) o CPZ $30 \mu M$ (b) seguida de CCK-8 $10^{-8}M$ bloquea la respuesta a esta última. En la figura 23 también se representa el efecto de la posterior perfusión con un medio que contenía $5 mM$ de Ca^{2+} , observándose una entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular como se ha comentado anteriormente.

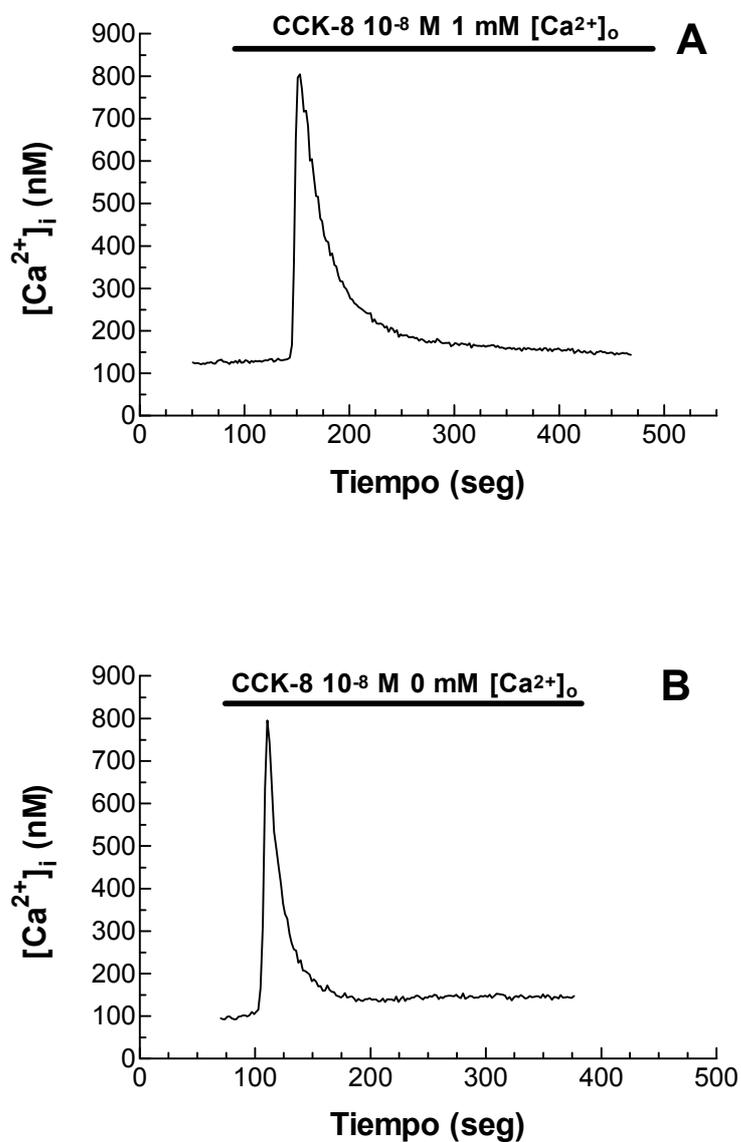


Figura 21. Registros que muestran los cambios producidos la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con CCK-8 10^{-8} M en presencia (A) y ausencia de Ca^{2+} (B) en el medio de perfusión.

En las mismas condiciones que acabamos de describir, la CCK-8 no producía ninguna modificación del pH_i (figura 24). Este efecto se repitió en la gran mayoría de las células, y sólo muy ocasionalmente algunas producían una minúscula acidificación (2/40 para la tapsigargina y 1/41 para el ciclopiazónico), aunque tanto la tapsigargina como la entrada de Ca^{2+} inducían acidificación ($0'021 \pm 0'004$ tras la tapsigargina y $0'034 \pm 0'007$ tras el CPZ). En cualquier caso estos resultados indican que la CCK-8 no produce acidificación cuando se bloquea la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares.

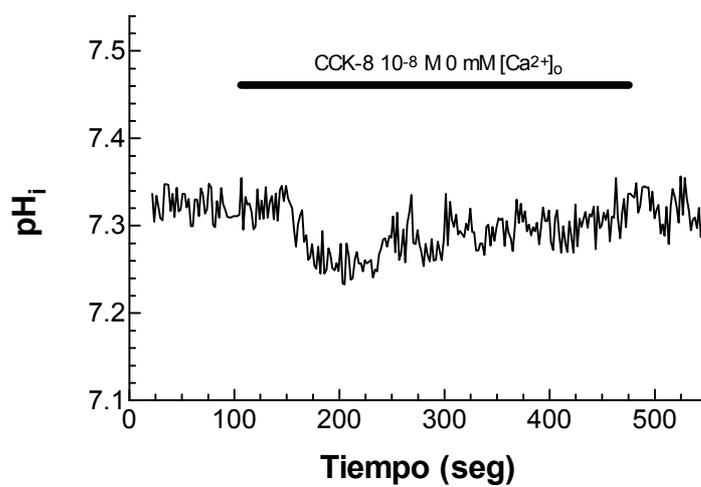


Figura 22. Registros en los que se muestran los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata tras su estimulación con CCK-8 10^{-8} M en medio libre de Ca^{2+} .

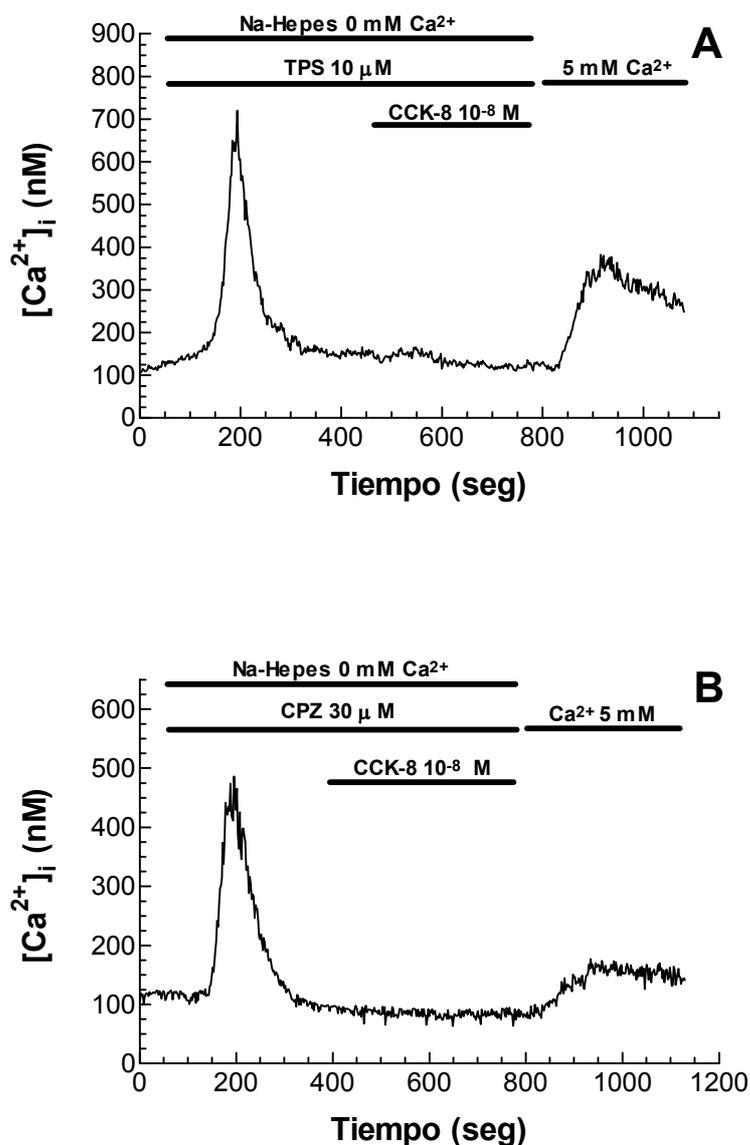


Figura 23. Registros que muestran los cambios producidos la $[Ca^{2+}]_i$ en células acinares pancreáticas de rata cuando se perfundían con un medio conteniendo tapsigargina 10 μM (A) y ácido ciclopiazónico 30 μM (B) en ausencia de Ca^{2+} . En las figuras también se muestra el efecto que presenta la posterior estimulación con CCK-8 10⁻⁸M y la reposición de Ca^{2+} en el medio de perfusión.

Una vez que el Ca^{2+} intracelular aumenta por acción de los agonistas, su concentración disminuye por dos mecanismos principalmente: reentrada en los depósitos y transporte al exterior de la célula.

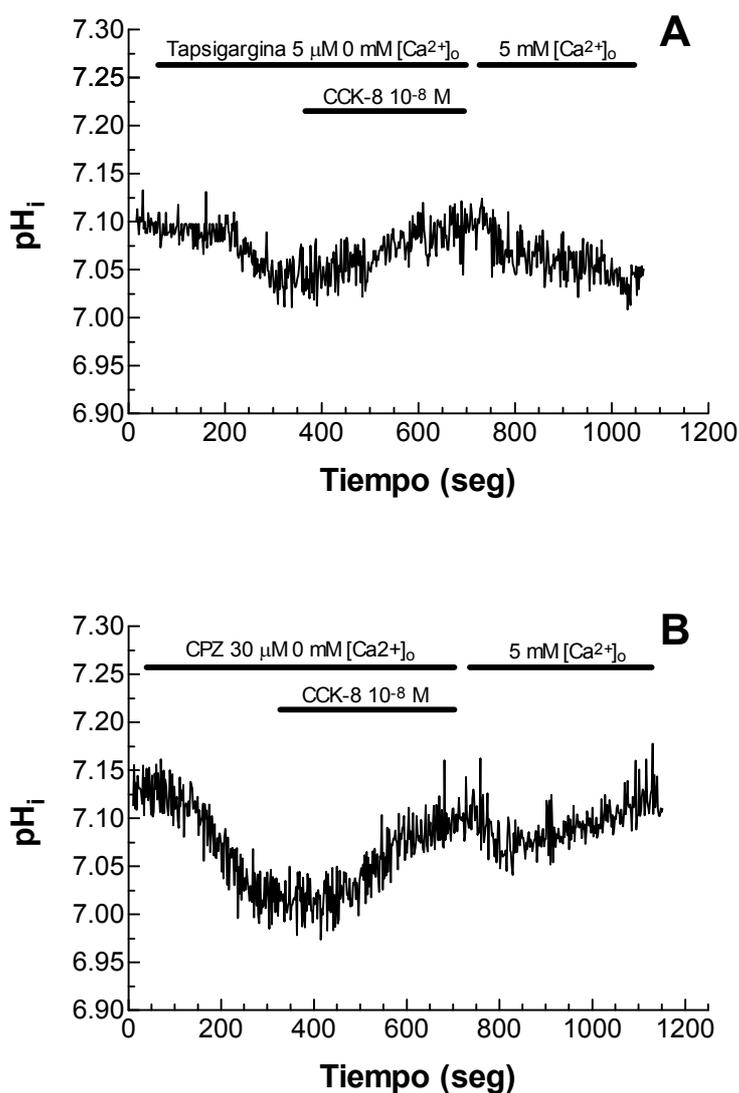


Figura 24. Registros que muestran los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata cuando se perfundían con un medio conteniendo tapsigargina 5 μ M (A) ó ácido ciclopiazónico 30 μ M (B) en ausencia de Ca^{2+} (representativos de 3 experimentos). En las figuras también se muestra el efecto que presenta la posterior estimulación con CCK-8 10^{-8} M y la reposición de Ca^{2+} en el medio de perfusión.

En condiciones de estimulación continuada con concentraciones máximas de agonistas, la reentrada neta en los depósitos es “puenteada” por el constante efecto del IP₃ (Camello y cols., 1996), y el principal mecanismo de transporte de Ca²⁺ es entonces la bomba de Ca²⁺ de la membrana plasmática. Estudios previos han demostrado que la bomba de Ca²⁺ de la membrana puede ser inhibida por concentraciones de La³⁺ del rango de milimolar (Toescu y Petersen, 1995) y por el uso de medios con pH alcalino (aproximadamente pH=8) (Tepikin, comunicación personal).

En la figura 25 está representado el efecto de la estimulación con CCK-8 (10⁻⁸M) sobre el pH_i bajo las siguientes condiciones experimentales: cuando la solución de perfusión contenía 1 mM de Cl₃La (figura 25 a) y cuando el pH extracelular se fijaba en 8 (figura 25 b). En presencia de La³⁺ en el medio de perfusión la acidificación (0'051 ± 0'006) resultaba atenuada frente a los experimentos control (0'069 ± 0'006), pero aumentaba ligera, aunque no significativamente (p>0'06) respecto a la respuesta inducida por CCK-8 en ausencia de Ca²⁺ en el medio extracelular (0'040 ± 0'004). La frecuencia de respuesta sin embargo, era significativamente menor que en ambos casos (_{0Ca}χ² = 37'4, p<0'005; _{1Ca}χ² = 69'5, p<0'005) reduciéndose de manera muy clara.

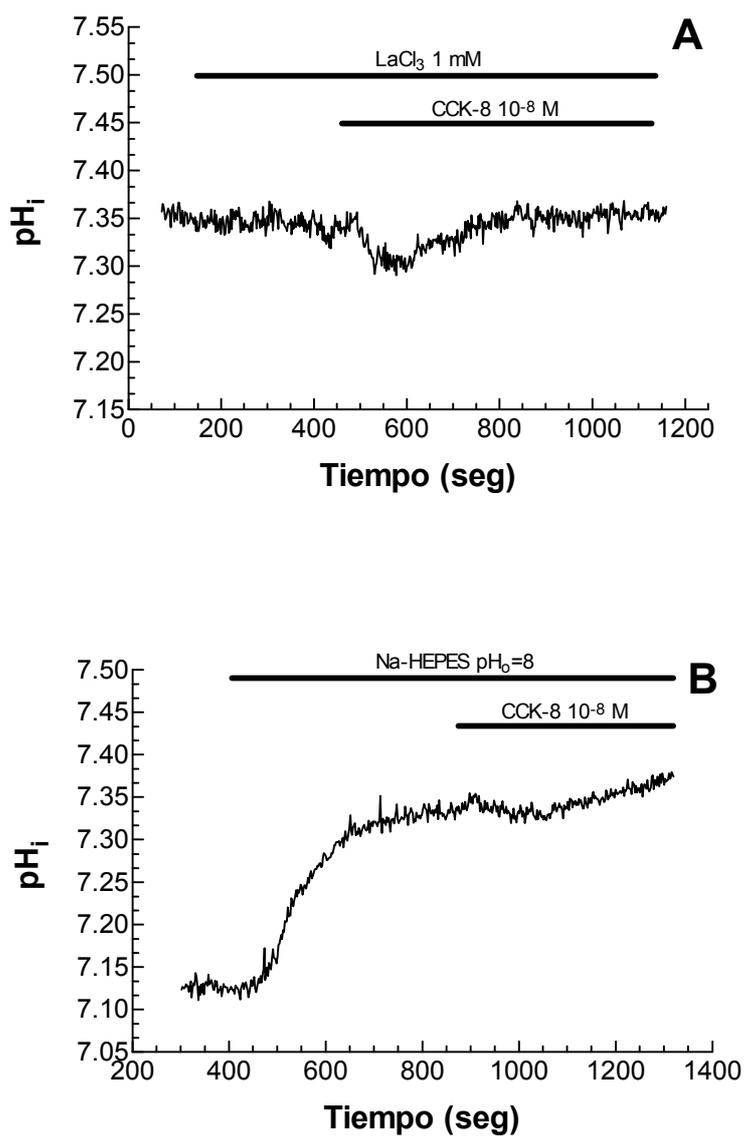


Figura 25. Registros que muestran los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata cuando se perfundían con un medio conteniendo Cl_3La 1 mM (A) ó con un $pH_o=8$ (B) y la respuesta a una posterior estimulación con CCK-8 $10^{-8}M$. En la soluciones no se añadió Ca^{2+} .

La perfusión con un medio a $\text{pH}_o=8$ produjo un aumento de pH_i de $0'235 \pm 0'017$ unidades de pH . En esas condiciones la aplicación de CCK-8 no produjo acidificación; tan solo 6 de 35 células estudiadas desarrollaron una débil respuesta ($0'016 \pm 0'003$), estadísticamente inferior a la de la CCK-8 en los experimentos control ($p < 0'005$) (figura 25 b). Este resultado indica que la inhibición de la bomba de Ca^{2+} de la membrana reduce la acidificación producida por CCK-8.

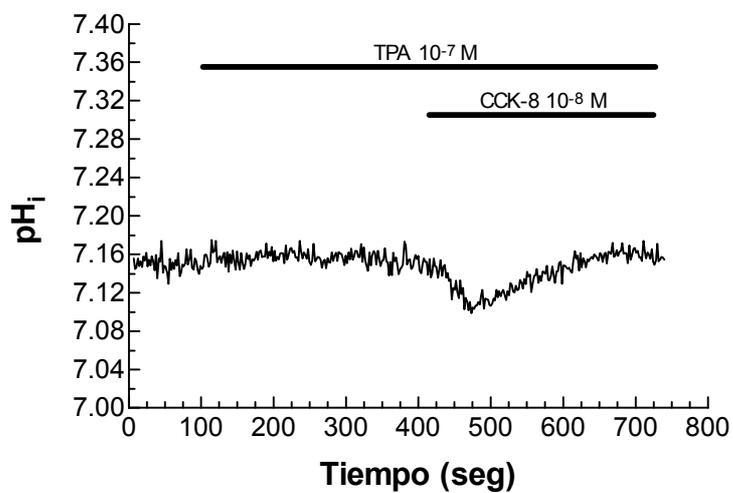


Figura 26. Registro que muestra el efecto producido sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata cuando se perfundían con un medio conteniendo TPA 10⁻⁷M, seguida de la estimulación posterior con CCK-8 10⁻⁸M.

4.3.3.- *Papel de la PK-C en la acidificación producida por CCK-8.*

Junto al incremento observado en la $[Ca^{2+}]_i$, está bien establecido que la CCK-8 y la ACh aumentan la actividad de la PK-C en las células acinares pancreáticas. Esta cinasa colabora con el ion Ca^{2+} para activar la célula e incrementar la secreción acinar de enzimas y electrolitos.

Para determinar si la activación de la PK-C participa en la acidificación por CCK-8, aplicamos el activador exógeno de la PK-C, TPA o PMA, a concentraciones capaces de provocar la activación de la cinasa y la secreción de amilasa. Como podemos observar en la figura 26, el TPA $10^{-7}M$ no produjo cambios significativos en el pH_i , aunque redujo la posterior acidificación por CCK-8 ($0'039 \pm 0'003$, $p < 0'005$ respecto a los controles). Por el contrario, la aplicación del inhibidor específico de la PK-C, el GFX109203 o bisindolilmaleimida ($5 \mu M$), inducía una progresiva y clara acidificación (figura 27) ($0'152 \pm 0'008$, $p < 0'0055$; 41 de 48 células estudiadas para el GFX), atenuando el posterior efecto acidificador de la CCK-8 ($0'028 \pm 0'001$ frente a la respuesta control; $p < 0'005$).

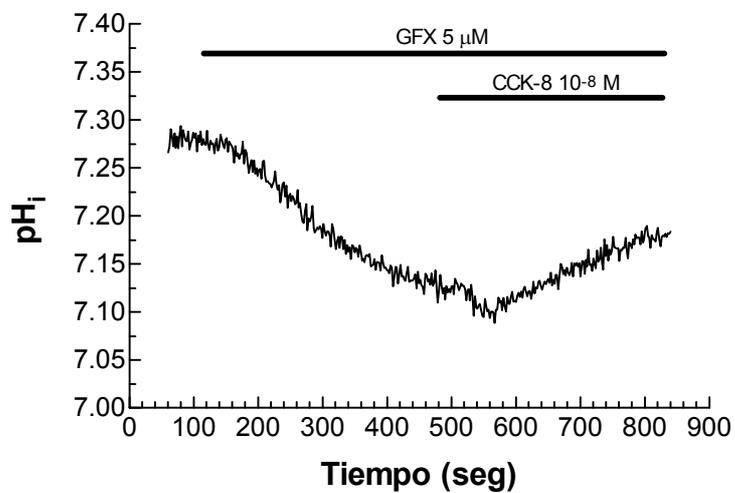


Figura 27. Registro que muestra los cambios producidos en el pH_i en células acinares pancreáticas de rata cuando se perfundían con un medio conteniendo GFX 5 μM, seguido de CCK-8 10⁻⁸M.

Una acidificación similar se obtuvo al usar otro inhibidor de la PK-C, la cheleritrina (12 μ M; 0.086 ± 0.007 , $p < 0.01$; 22 de 29 células estudiadas). Ninguno de estos compuestos es ácido, y sus mecanismos de acción sobre la PK-C son diferentes, además de no estar relacionados químicamente, por lo que no cabe esperar que la acidificación sea un artefacto.

En conjunto estos resultados indican que la PK-C no es responsable directamente de la acidificación en respuesta a la CCK-8, si bien la inhibición de su actividad la reduce.

4.3.4.- Cambios de volumen celular y variaciones de pH_i

Durante la estimulación con secretagogos como ACh o CCK-8 las células acinares pueden experimentar dos fenómenos: una reducción del volumen celular (“cell shrinkage”) y despolarización de la membrana plasmática (Petersen, 1992).

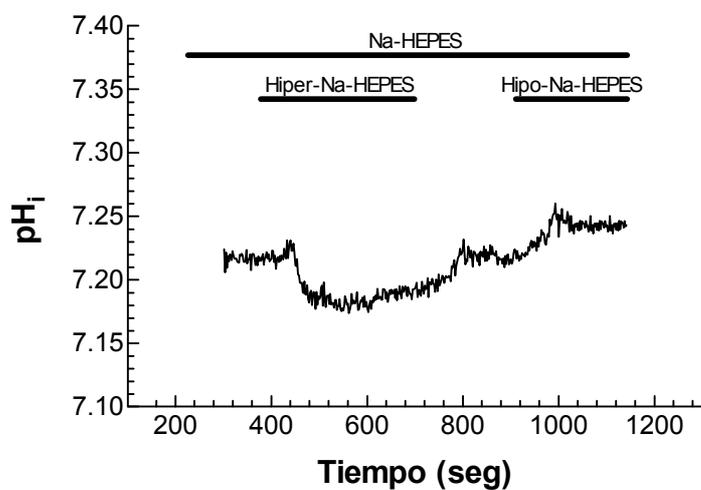


Figura 28. Registro que muestra el efecto que la modificación del volumen celular presenta sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata. Las células se perfundían con un medio hipertónico (210 mM ClNa) e hipotónico (70 mM ClNa).

Dado que la reducción transitoria del volumen celular podría aumentar la $[H^+]_i$ y reducir así el pH_i , realizamos unos experimentos en los que las células eran perfundidas con un medio hipertónico (210 mM NaCl). Este tratamiento produjo una acidificación significativa en las células ($0'036 \pm 0'002$), con un valor inferior a la producida por CCK-8 ($p < 0'005$) (figura 28). La transición a un medio hipotónico produjo el efecto contrario en todas las células estudiadas, observándose una alcalinización transitoria. En cuanto a la despolarización, provocada por la perfusión con un medio con alto contenido en K^+ , no produjo cambios significativos en el pH_i (figura 29).

4.3.5.- Intercambio Na^+/H^+ y acidificación por CCK-8.

En una última instancia realizamos experimentos para intentar determinar si la CCK-8 produce acidificación mediante una inhibición transitoria de la actividad del antitransporte Na^+/H^+ , que es el principal sistema de control del pH_i en estas células en ausencia de HCO_3^- extracelular. Para ello las células se perfundían con una solución sin Na^+ extracelular (reemplazado por NMDG) antes y durante la estimulación con CCK-8.

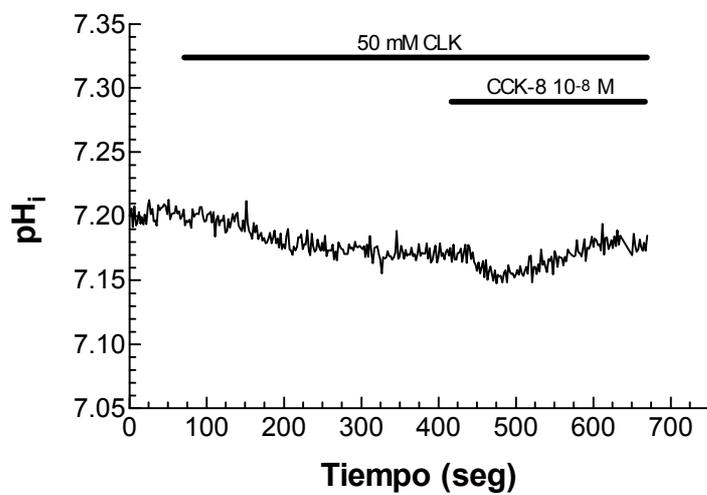


Figura 29. Registro que muestra el efecto que la perfusión con un medio conteniendo 50 mM de CLK presenta sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata, seguido de la estimulación con CCK-8 10⁻⁸M.

En la figura 30 se observa que la sustitución del Na⁺ extracelular produce una acidificación debida a que el funcionamiento del antitransportador se invierte (Muallem y Loessberg, 1990).

La estimulación con CCK-8 (10⁻⁸M) en ausencia de Na⁺ aún produce una pequeña acidificación, si bien de escasa magnitud (0'02 ± 0'007) y en un porcentaje de células inferior al de los experimentos con CCK-8 sola (8 de 80 frente a 91 de 98 en los controles; $\chi^2 = 231'2$, p<0'005).

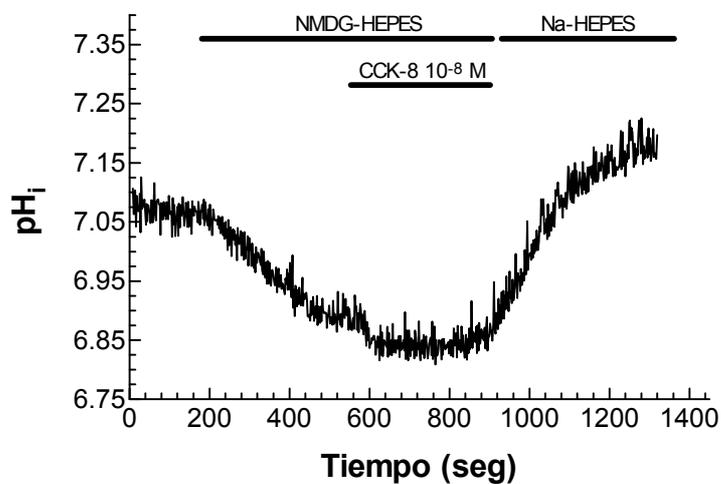


Figura 30. Registro que muestra el efecto que la supresión del ion Na^+ en el medio de perfusión (sustitución por NMDG) presenta sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata. En esta situación se sólo produce una pequeña respuesta tras la posterior estimulación con CCK-8 10^{-8} M.

Aunque este resultado podría hacer pensar que la CCK-8 inhibe pasajeramente el intercambio Na^+/H^+ , es posible que la reducción en la respuesta a la CCK-8 se deba a la acidez presente en el interior celular en el momento de la aplicación de la hormona. Por tanto realizamos dos protocolos que permitieran comprobar esta posibilidad.

La perfusión de las células con una solución extracelular de $\text{pH}=7$ produce una acidificación intracelular de $0'150 \pm 0'017$ unidades de pH (44 células) (figura 31). En estas condiciones de acidez intracelular, la CCK-8 actuó de modo similar a como lo hizo en ausencia de Na^+ extracelular: la acidificación era menor que en los controles ($0'015 \pm 0'005$) y la frecuencia de respuesta se redujo significativamente (17 de 44 células estudiadas; $\chi^2 = 44'1$, $p < 0'005$).

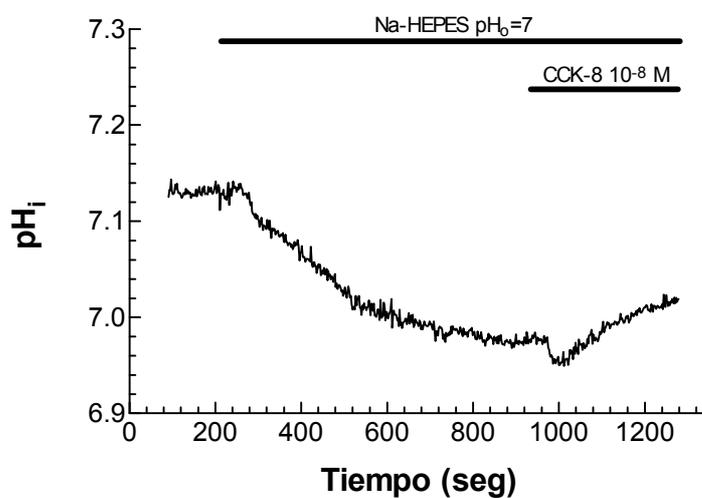


Figura 31. Registro que muestra el efecto que la perfusión con un medio ácido ($pH_o=7$) presenta sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata, seguida de la estimulación con CCK-8 10^{-8} M. Representativo de 3 experimentos.

La aplicación de un pulso de NH_4Cl 30 mM produce una alcalinización rápida durante la presencia del mismo, seguida de una brusca y acentuada acidificación al retirar esta base débil del medio de perfusión (figura 32). Tras esto, el pH_i aumenta hacia valores cercanos a los basales. Esta recuperación se debe, en ausencia de HCO_3^- , a la actividad del intercambiador Na^+/H^+ (Muallem y Loessberg, 1990). La aplicación de CCK-8 durante esta fase de recuperación, cuando el intercambiador está activo, no produjo cambios en el perfil de aumento del pH_i (figura 32).

La reducción en la acidificación inducida por CCK-8 en ausencia de Na^+ no se debe a que la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a la hormona resulte inhibida; como puede observarse más adelante en la figura 38, la CCK-8 en esta situación produce una respuesta normal. Este resultado es similar a lo indicado por otros autores (Tepikin y cols., 1992).

En conjunto estos resultados sugieren que la CCK-8 no produce una inhibición del intercambiador Na^+/H^+ como mecanismo final de la acidificación.

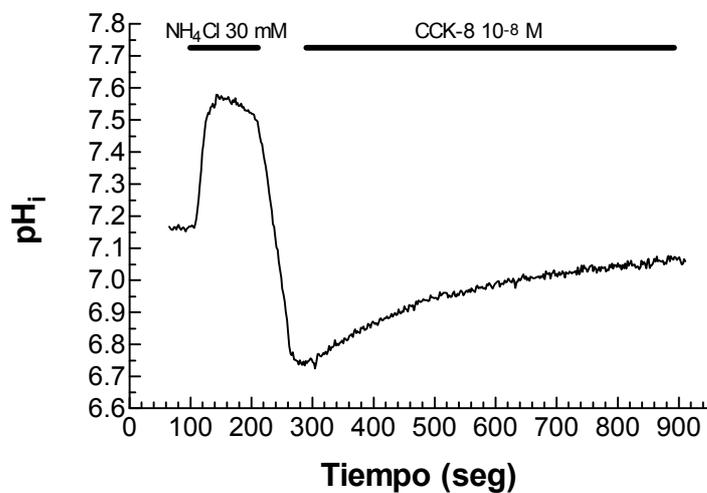


Figura 32. Registro que muestra el efecto que la aplicación de un pulso de NH₄Cl 30 mM presenta sobre el pH_i en células acinares pancreáticas de rata seguida de la perfusión de las células con CCK-8 10⁻⁸M. Representativo de 3 experimentos.

4.3.6.- Efecto del pH_i sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

En la figura 33 se muestra el efecto de la perfusión de las células acinares pancreáticas con una solución 20 pM de CCK-8. Como había sido descrito previamente, a esta concentración la CCK-8 condujo a la aparición de oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en la mayoría de las células. La $[Ca^{2+}]_i$ basal estaba entorno a 70-100 nM, y las oscilaciones tenían un amplitud de hasta 300-400 nM, con una frecuencia, bastante repetitiva y estable, de 2 ciclos cada 100 segundos. Estos valores están dentro del rango de lo publicado con anterioridad por otros grupos.

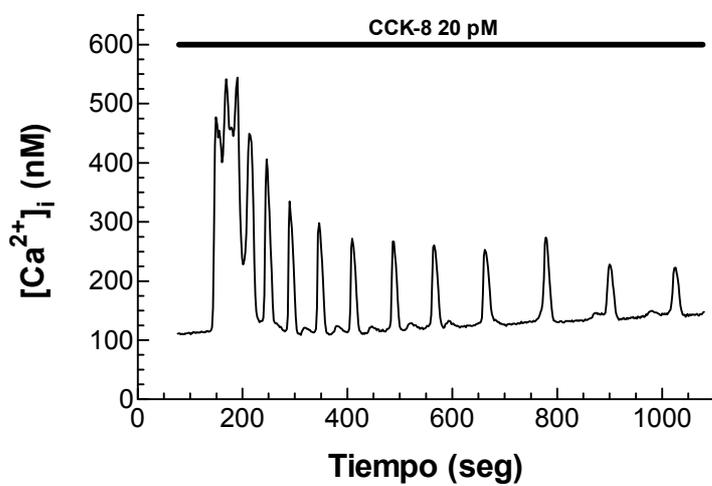


Figura 33. Efecto de la perfusión de las células acinares pancreáticas con una solución 20 pM de CCK-8 sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

Previamente otros autores han demostrado que los cambios en el pH_o pueden afectar a la señal de Ca^{2+} (ver Tsunoda, 1994). Como nuestro objetivo era determinar el efecto del pH_i sobre este parámetro, y con el fin de modificar el pH_i sin tener que modificar el pH_o empleamos tres protocolos diferentes: aplicaciones de pulsos de NH_4Cl 30 mM y propionato sódico 15 mM, y sustitución del Na^+ del medio extracelular por NMDG. Los efectos de estos tres tratamientos sobre el pH_i se muestran en la figura 34.

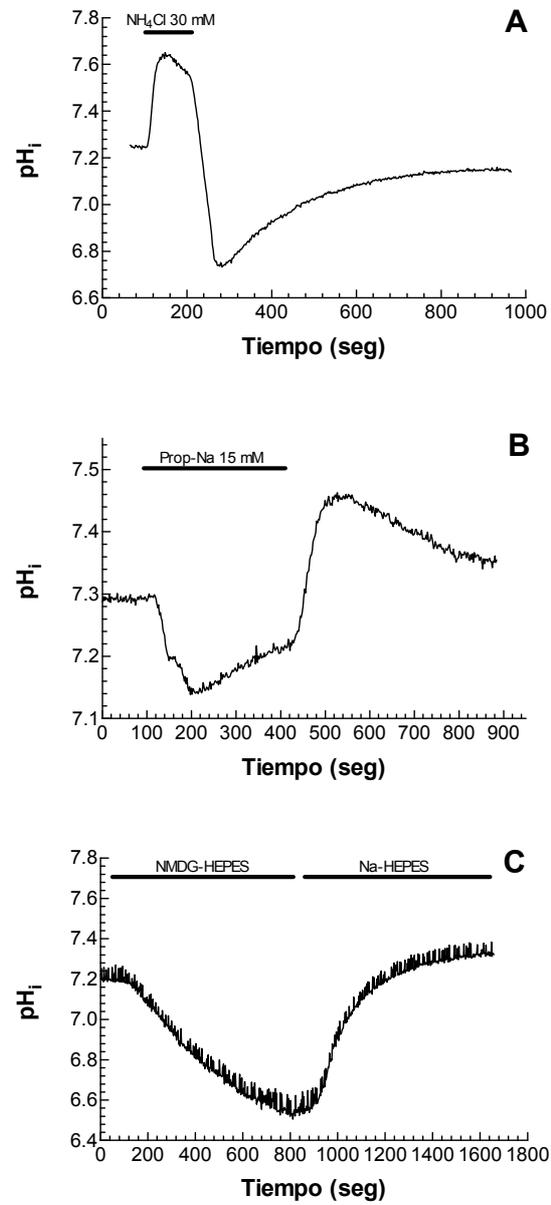


Figura 34. Efecto de la perfusión de las células acinares pancreáticas con una solución 30 mM de NH_4Cl (A), 15 mM de propionato-Na (B) y NMDG (C) sobre el pH_i .

Tanto el NH_4Cl como el propionato sódico producen un cambio bifásico en el pH_i . En el caso del NH_4Cl hay una alcalinización brusca durante su aplicación (0.298 ± 0.012 unidades de pH ; 86 células estudiadas en 6 experimentos independientes), seguida de una acidificación una vez que se ha retirado (-0.793 ± 0.020 unidades de pH , hasta un valor medio de pH_i de 6.70 ± 0.02). La perfusión con propionato sódico provoca una acidificación inicial (-0.219 ± 0.013 unidades de pH , hasta un pH_i medio de 7.02 ± 0.03 ; 54 células estudiadas en 5 experimentos independientes) para tras su retirada conducir a una alcalinización de las células hasta un pH_i medio de 7.40 ± 0.03 .

En cuanto al NMDG, su introducción en lugar del Na^+ indujo una lenta y clara acidificación intracelular hasta llegar a un valor medio de pH_i de 6.60 ± 0.04 (-0.639 ± 0.025 unidades de pH ; 61 células estudiadas en 4 experimentos independientes). Esta se vio seguida de una recuperación del pH_i una vez que este ion se repuso en el medio de perfusión (figura 34 c).

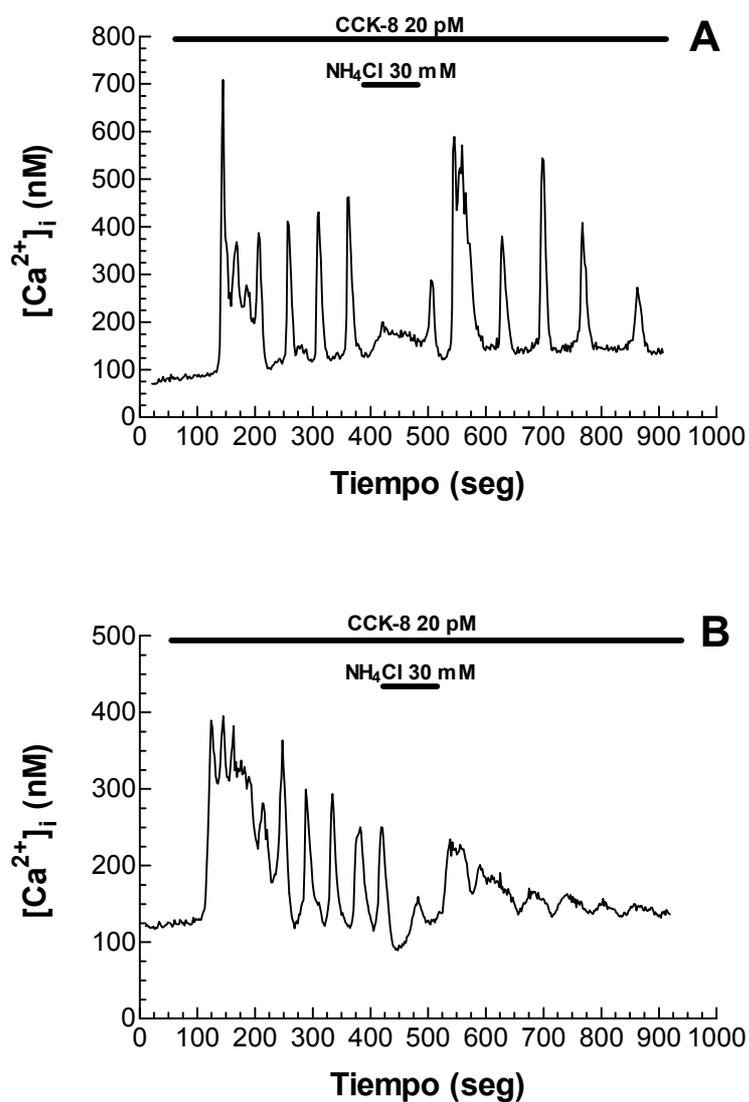


Figura 35. Efecto de la perfusión de las células acinares pancreáticas con una solución 30 mM de NH_4Cl , sobre el patrón oscilatorio de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la estimulación con CCK-8 20 pM.

Cuando se perfundieron las células con NH_4Cl 30 mM en presencia de CCK-8 20 pM, las oscilaciones inducidas por la hormona se inhibieron de forma rápida y total (41 células de 41 estudiadas; cuatro experimentos independientes), por este tratamiento (figura 35). Este bloqueo era total o parcialmente reversible ya que la retirada de NH_4Cl era seguida de la recuperación del patrón oscilatorio en una parte del total de las células (10 células de 41 estudiadas) (figura 35 a) aunque en la mayoría de ellas las oscilaciones permanecían inhibidas o bloqueadas (31 células de 41 estudiadas) (figura 35 b). Tras la retirada del NH_4Cl del medio de perfusión, las células manifestaron un incremento transitorio en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (25 células de 41 estudiadas).

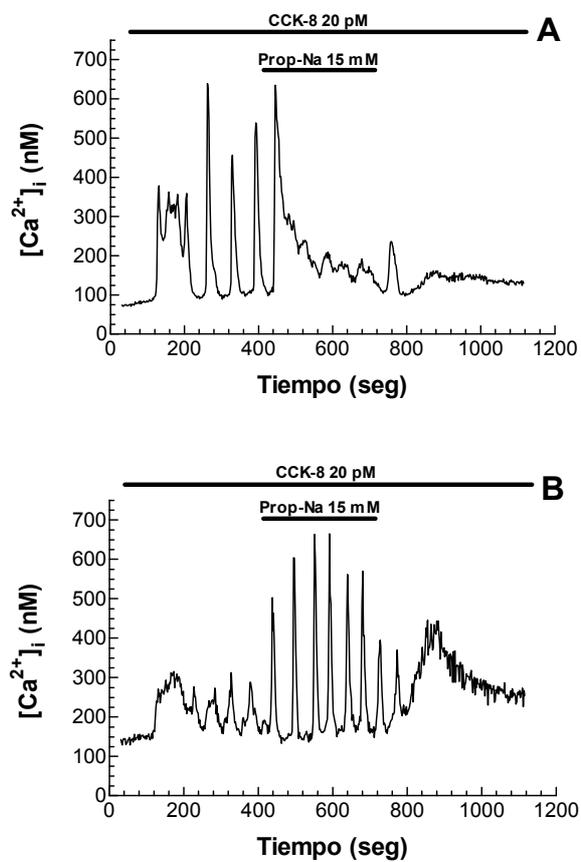


Figura 36. Efecto de la perfusión de las células acinares pancreáticas con una solución 15 mM de propionato-Na, sobre el patrón oscilatorio de Ca^{2+} inducido por la estimulación con CCK-8 20 pM.

Cuando las células se perfundían con un medio con propionato sódico, en presencia de concentraciones submáximas de CCK-8 (20 pM), se pudieron observar dos comportamientos diferentes en el patrón oscilatorio (figura 36). En la mayor parte de los casos (40 células de 60 estudiadas; 5 experimentos independientes), la presencia de propionato sódico abolió las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ tras una liberación inicial de Ca^{2+} (figura 36 a), mientras que en el resto el patrón oscilatorio no se inhibía; incluso algunas de las oscilaciones aumentaban en presencia de propionato (9 células de 60 estudiadas) (figura 36 b). En todos los casos la retirada del propionato sódico del medio de perfusión tuvo como resultado un eliminación total del patrón oscilatorio del Ca^{2+} citosólico.

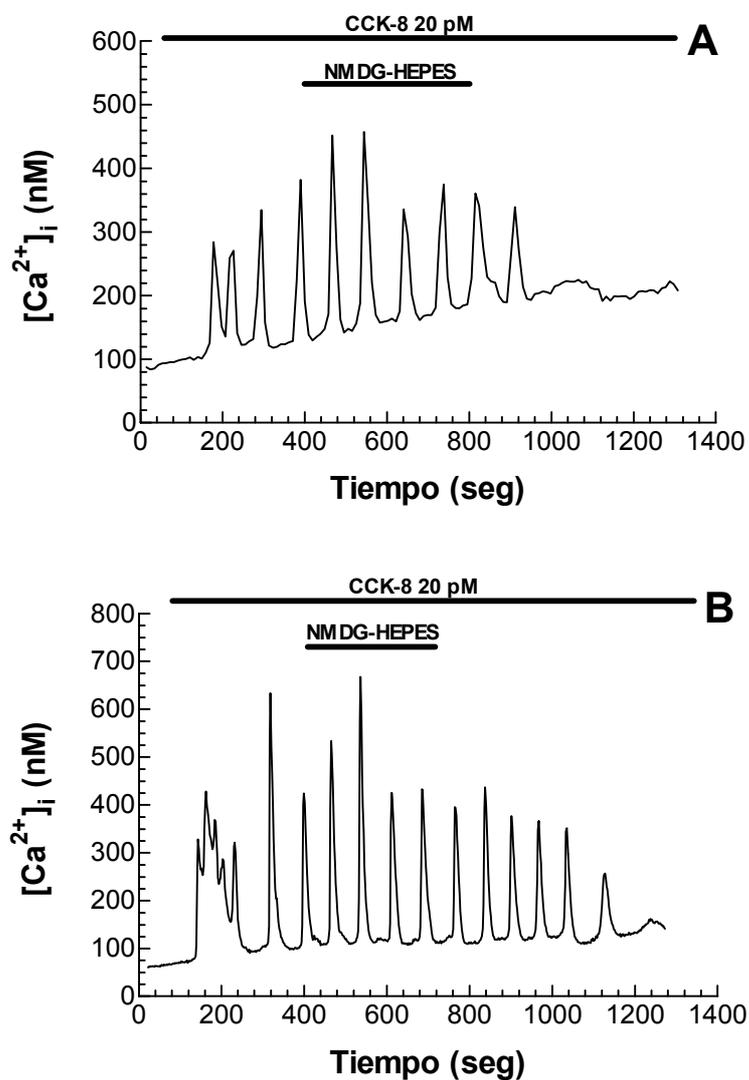


Figura 37. Efecto de la perfusión de las células acinares pancreáticas con un medio libre de Na^+ (sustituido por NMDG), sobre el patrón oscilatorio de Ca^{2+} inducido por la estimulación con CCK-8 20 pM.

Mientras que el NH_4Cl y el propionato sódico modifican el pH_i atravesando las membranas biológicas, de manera que también afectan a los gradientes de pH_i entre distintos compartimentos intracelulares, la sustitución del Na^+ por NMDG produce una acidificación básicamente citosólica, al revertir el intercambio Na^+/H^+ . Como se puede observar en la figura 37, este tratamiento no produjo cambios en el patrón oscilatorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, aunque la reintroducción del Na-HEPES inhibió lentamente la señal de Ca^{2+} en la mayoría de las células (30 de 42 células estudiadas; 5 experimentos independientes).

El efecto de la manipulación del pH_i sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en las células acinares pancreáticas perfundidas con NMDG, propionato sódico y NH_4Cl , se representan en las figuras 38, 39 y 40. La ausencia de Na^+ en el medio de perfusión no tuvo efectos significativos sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tanto en medio conteniendo Ca^{2+} como libre del mismo (figura 38).

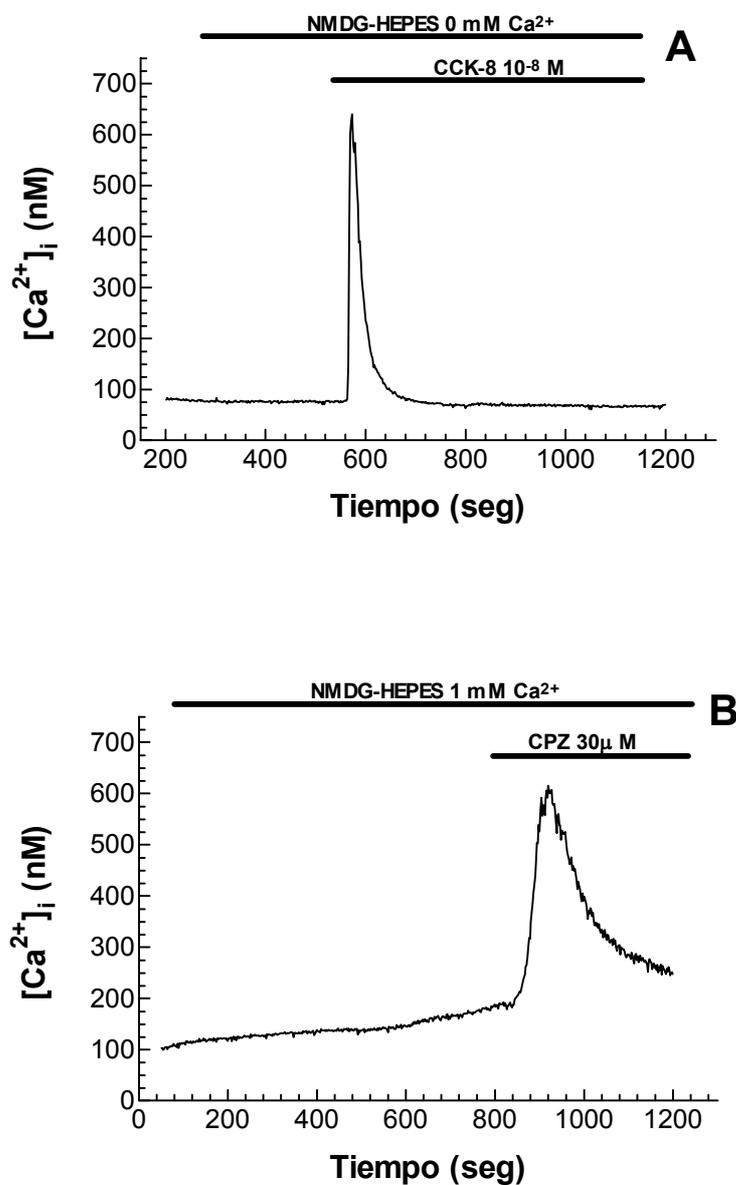


Figura 38. Efecto de los cambios producidos en el pH_i sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal en las células acinares pancreáticas perfundidas con un medio libre de Na^+ (sustituido por NMDG), en medio con y sin Ca^{2+} . En cada registro se muestra un control de movilización de Ca^{2+} con CCK-8 10^{-8} M (A) o CPZ 30μ M (B). Este registro es representativo de 4 experimentos.

La aplicación posterior de CCK-8 o CPZ produjo el efecto similar a los experimentos controles. La perfusión de las células con propionato sódico 15 mM también manifestó ser inefectiva sobre la $[Ca^{2+}]_i$; sin embargo durante el período en que se retiró del medio de perfusión (en la fase alcalina) la $[Ca^{2+}]_i$ se incrementó ligeramente y de manera transitoria en un porcentaje de células (34 células de 60 estudiadas; 5 experimentos independientes) (figura 39). Finalmente, la aplicación de un pulso de NH_4Cl 30 mM también indujo cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, produciéndose un incremento inicial transitorio, tanto en presencia (67 células de 84 estudiadas; 6 experimentos independientes) como en ausencia (41 de 54 células estudiadas en 4 experimentos independientes) de Ca^{2+} en el medio extracelular.

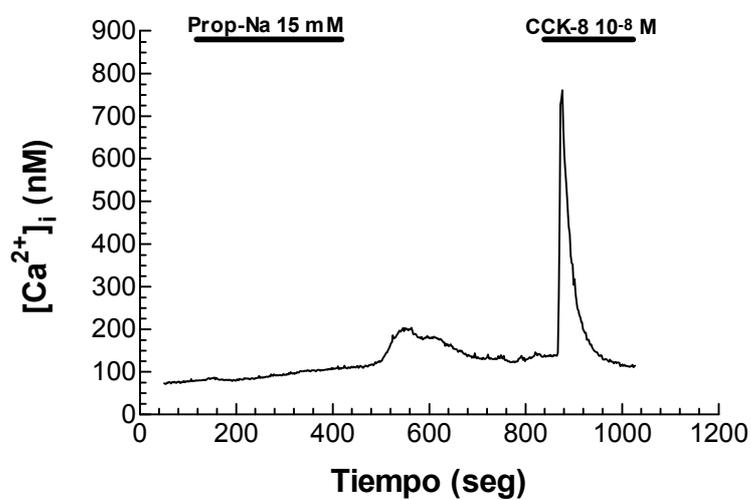


Figura 39. Efecto de los cambios producidos en el pH_i sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal en las células acinares pancreáticas perfundidas con propionato-Na 15 mM. Al final del experimento se aplicó un control de CCK-8 10^{-8} M.

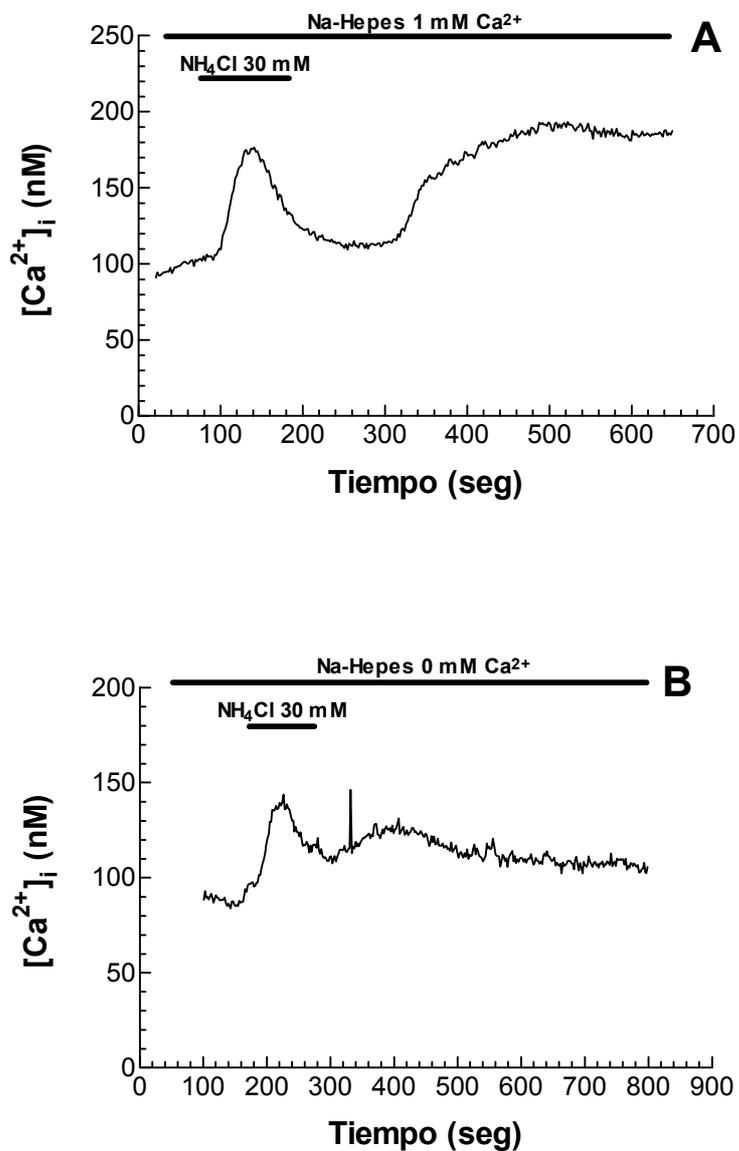


Figura 40. Efecto de los cambios producidos en el pH_i sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en las células acinares pancreáticas perfundidas con NH_4Cl 30 mM en presencia (A) y ausencia (B) de Ca^{2+} en el medio de perfusión.

La retirada del NH_4Cl (fase de acidificación) produjo un ligero pero mantenido incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (84 de 84 en un medio con Ca^{2+} y 40 de 50 en ausencia del mismo) (figura 40). Cuando se realizaban dos aplicaciones de NH_4Cl sobre las mismas células, la alcalinización observada durante el segundo pulso no producía aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sino una disminución hasta la reintroducción del medio extracelular normal (figura 41 a), momento en que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vuelve de nuevo a aumentar.

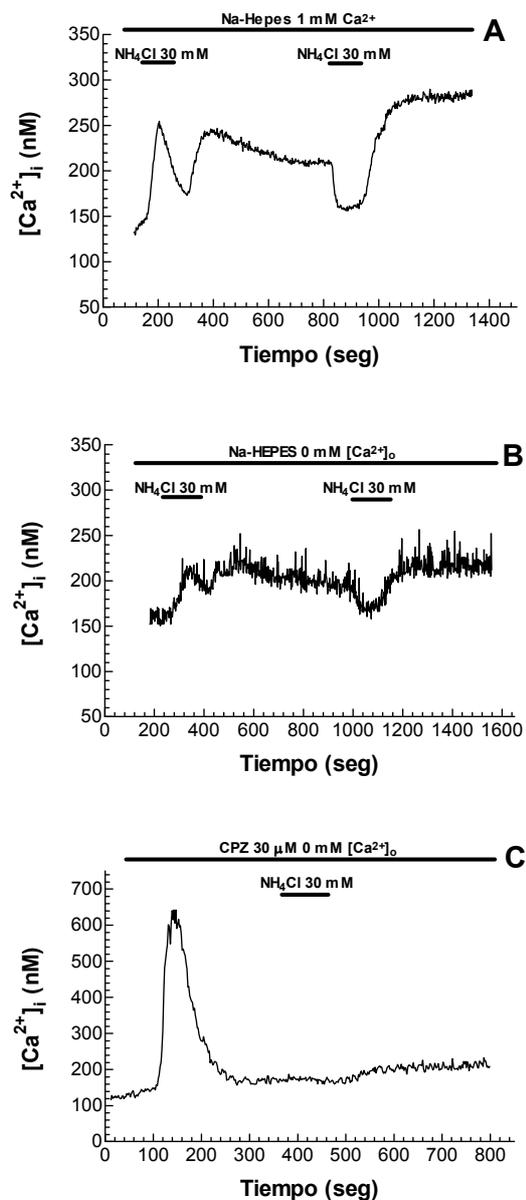


Figura 41. Efecto de la aplicación de un pulso de NH_4Cl 30 mM sobre la $[Ca^{2+}]_i$ cuando las células fueron tratadas previamente con un pulso de NH_4Cl en presencia (A) y ausencia (B) de este ion en el medio extracelular, y con ácido ciclopiazónico 30 μM (un inhibidor de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo) en ausencia de Ca^{2+} extracelular (C). Estos registros son representativos respectivamente de 4, 2 y 3 experimentos independientes.

Este efecto de un segundo pulso de NH_4Cl se produjo tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular (figura 41b). De la misma manera, la aplicación previa de ácido ciclopiazónico inhibe el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido por la presencia de NH_4Cl (figura 41 c) (3 experimentos independientes).

El efecto de las manipulaciones del pH_i sobre la señal de Ca^{2+} puede ser el resultado de cambios en la función de varios sistemas de transporte de este ion presentes en las células acinares pancreáticas, como podrían ser mecanismos que retiran Ca^{2+} del citosol (la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática y bombas que acumulan Ca^{2+} en los depósitos intracelulares) y canales que permitan su liberación desde los depósitos (activados por IP_3 y probablemente por otros mensajeros) y/o su entrada desde el medio extracelular. Por tanto realizamos experimentos para determinar si el pH_i modula la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.

4.3.7.- Efecto del pH_i sobre el influx de Ca^{2+} .

Previamente se ha podido demostrar que los protones extracelulares inhiben la entrada de Ca^{2+} en las células acinares pancreáticas (Muallem y cols., 1989) y está bien establecido que la entrada de Ca^{2+} se activa una vez que los depósitos intracelulares se han vaciado. Así, nosotros investigamos la posibilidad de que los cambios en el pH_i modificaran la movilización del Ca^{2+} inhibiendo la entrada del mismo, para lo cual ensayamos el efecto de la eliminación del Na^+ del medio extracelular, del NH_4Cl y del propionato sódico sobre el “influx” de Ca^{2+} inducido por la deplección de los depósitos celulares mediante el tratamiento con un inhibidor de la bomba de Ca^{2+} del retículo, el ácido ciclopiazónico (Seidler y cols., 1989). Tras la administración de este compuesto (a la concentración de $30 \mu\text{M}$) en un medio libre de Ca^{2+} , la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incrementa de manera transitoria. Restituyendo la concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular se desencadena la entrada de este ion en el citoplasma de las células, alcanzando un valor estable que es índice de que esta entrada de Ca^{2+} realmente está teniendo lugar. Como se puede apreciar en la figura 42, ninguno de los tres tratamientos indujo cambios en la entrada de Ca^{2+} en las células acinares pancreáticas. El tratamiento con NH_4Cl 30 mM , indujo una pequeña y repetitiva caída en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante el período de “influx” de Ca^{2+} (figura 42 b), sin bloquearla; este efecto fue similar al que se encontró cuando el

NH₄Cl era aplicado en ausencia de Ca²⁺ externo en células con una [Ca²⁺]_i ligeramente elevada (figura 41 b), lo que es indicativo de que esta aparente inhibición de la entrada de Ca²⁺ en las células no es real. Incluso, al retirar el NH₄Cl se produjo ocasionalmente un aumento transitorio en la [Ca²⁺]_i.

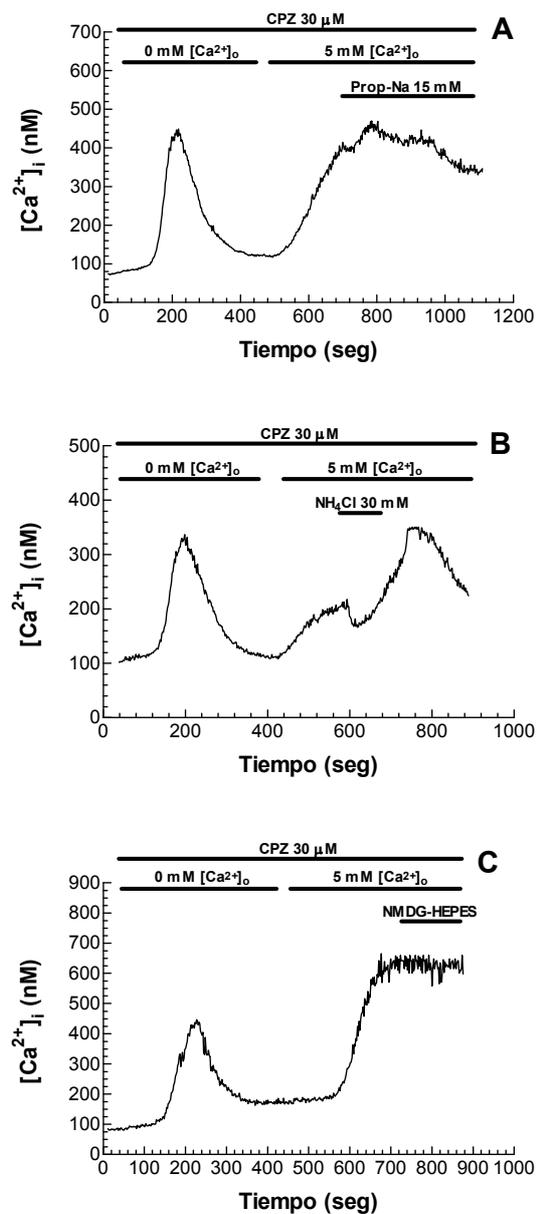


Figura 42. Figura que muestra el efecto del tratamiento con propionato-Na 15 mM (A), NH_4Cl 30 mM (B) y ausencia de Na^+ en el medio de perfusión (sustitución de Na^+ por NMDG) (C) sobre la entrada de Ca^{2+} en células acinares pancreáticas previamente estimuladas por ácido ciclopiazónico 30 μ M.

5.- DISCUSIÓN

5.1- Experimentos en suspensiones acinares.

5.1.1.- Efecto de la CCK-8, ach, histamina y agonistas de los receptores de la histamina sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

Desde hace algún tiempo se sabe que ACh y CCK promueven incrementos transitorios en la $[Ca^{2+}]_i$ de células pancreáticas exocrinas. En nuestros experimentos la estimulación con una concentración de 10^{-5} M de ACh produjo un rápido y marcado incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, alcanzando un valor máximo a los 3-5 segundos de la adición del estímulo a la cubeta. Este aumento era seguido de una progresiva disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ hasta alcanzar un valor estable aproximadamente a los 5 minutos de la estimulación, valor que se situaba ligeramente por encima del basal. Un patrón de respuesta similar se obtuvo cuando las suspensiones celulares se estimularon con CCK-8 10^{-8} M, si bien esta hormona manifestó presentar una mayor potencia en la respuesta movilizadora de Ca^{2+} intracelular generada.

La estimulación de las células acinares con concentraciones menores de ACh condujo a un patrón de movilización de Ca^{2+} similar, pero de menor amplitud, alcanzándose valores máximos de $[Ca^{2+}]_i$ inferiores, comparados con los producidos por la estimulación con ACh 10^{-5} M; así el comportamiento de la liberación de Ca^{2+} en las células acinares pancreáticas manifestó ser dependiente de la dosis del agonista aplicado.

Sin embargo la ruta intracelular que utiliza la histamina para promover las respuestas secretoras en el páncreas exocrino permanece aún poco clara. Estudios previos empleando animales anestesiados habían demostrado que este agente paracrino presenta efectos estimuladores sobre la secreción pancreática exocrina; es capaz de inducir incrementos en el flujo pancreático y en la secreción de HCO_3^- en el perro (Tankel y cols., 1957; Iwatsuki y cols., 1981), de jugo pancreático y enzimas digestivas en conejo (Pariente y cols., 1989, 1990) y de jugo pancreático y contenido total de proteínas en cobaya (Alcón y cols., 1995).

Estudios realizados en diferentes tipos celulares han demostrado que la activación de los receptores tipo H1 de la histamina conducen a un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ como

se ha descrito en células endoteliales (Diarra y Sauvé, 1992) o en células de médula adrenal de rata (Warashina, 1992). De igual manera se han descrito acciones de la histamina mediadas a través de la vía del AMPc, estudios realizados sobre células gástricas de cobaya (Cheret y col., 1984), hombre (Sarem-Aslani y col., 1992), en cultivos celulares de cerebro de rata (Agulló y col., 1990) y en glándula submandibular de cobaya (Saeki y col., 1981).

Los resultados presentados en esta memoria demuestran que las respuestas secretoras del páncreas exocrino, descritas por otros autores, en respuesta a la estimulación por histamina no está asociada con una elevación detectable con nuestros métodos en la $[Ca^{2+}]_i$, al menos con ninguna de las dosis ensayadas.

Se ensayaron además tres agonistas diferentes, uno para cada tipo de receptor: 2-PEA (H1), dimaprit (H2) y α -metilhistamina (H3), y ninguno de ellos indujo variaciones detectables en la $[Ca^{2+}]_i$. Estos agentes se ensayaron a las mismas dosis que las empleadas para el caso de la ACh y la histamina.

En otro estadio de la primera parte de los experimentos se ha visto que, en ningún caso, la movilización de Ca^{2+} en respuesta a la administración de ACh se ve afectada por la presencia previa de histamina o de los agonistas de sus receptores.

De igual manera que se han descrito acciones de la histamina mediadas a través de la vía del AMPc en otros tipos celulares, en el caso del páncreas exocrino podría suceder el mismo caso, lo cual ha sido objeto de investigaciones en nuestro laboratorio y han dado como resultado que la histamina podría estar mediando su acción utilizando el AMPc como segundo mensajero en las respuestas secretoras de esta glándula (Lajas y cols., 1995; González y cols., en prensa), datos que no han sido incluidos en esta memoria.

5.1.2.- Cambios en la concentración de magnesio en respuesta a la estimulación de las células acinares pancreáticas.

Los resultados de nuestros estudios demuestran que la hormona intestinal CCK-8 y el neurotransmisor colinérgico ACh son capaces de inducir cambios en las $[Mg^{2+}]_i$ y $[Mg^{2+}]_o$ en condiciones fisiológicas. Ambos secretagogos estimularon un incremento

inicial en la $[Mg^{2+}]_i$ seguido de una disminución progresiva, alcanzando un valor estable al cabo de 4-5 minutos de la estimulación. Si bien el patrón de movilización del ion Mg^{2+} fue similar al observado para el ion Ca^{2+} , cabe destacar que la posterior disminución que se observaba en la $[Mg^{2+}]_i$ fue ligeramente mayor que sobre la $[Ca^{2+}]_i$, alcanzándose valores a los 4-5 minutos claramente inferiores a los observados en condiciones basales. Esta disminución observada en la $[Mg^{2+}]_i$ está probablemente asociada a una elevación de la $[Mg^{2+}]_o$, es decir una salida al medio extracelular como así demuestran los resultados obtenidos con la sal tetrapotasio de mag-fura-2. Los cambios hallados por nosotros en la $[Mg^{2+}]_i$ han sido descritos también para el agente colinérgico carbacol (Hurley y cols., 1992). Por el contrario la estimulación con el agente paracrino histamina no manifestó tener efectos sobre la $[Mg^{2+}]_i$ o sobre la salida de Mg^{2+} al medio extracelular.

Los resultados obtenidos en esta sección también han revelado que una vez que el Mg^{2+} intracelular ha sido movilizado por la ACh, una posterior estimulación con CCK-8 no produce nuevos cambios en la $[Mg^{2+}]_i$, lo que sugiere que este ion podría ser liberado desde un mismo depósito que sería sensible tanto a la estimulación por ACh como por CCK-8. Resultados similares se han obtenido en células pancreáticas aisladas, en las que la estimulación con CCK-8 se realizaba previo tratamiento de las mismas con agentes movilizadores de Ca^{2+} , como la ionomicina o la tapsigargina, (Wisdom y cols., 1995). Además, nuestros resultados indican que cuando se administra CCK-8 a células previamente estimuladas con histamina, no se producen cambios significativos en la respuesta inducida por la CCK-8 sobre la $[Mg^{2+}]_i$ en. Este hecho indica que no parece existir interacción alguna entre la histamina y la CCK-8 en las células acinares pancreáticas, al menos en lo referente a la homeostasis de este ion. En estudios previos se ha demostrado la existencia de interacciones entre secretina y ACh o CCK-8 sobre la movilización de Mg^{2+} (Singh y cols., 1992; Wisdom y cols., 1994). La combinación de ACh y secretina atenuaba la disminución observada en la $[Mg^{2+}]_i$ en respuesta a la estimulación con ACh.

En medio nominalmente libre de Mg^{2+} , la $[Mg^{2+}]_i$ basal no se ve afectada si se comparan sus valores con la existente en medio conteniendo Mg^{2+} , además de que las respuestas inducidas por la estimulación tanto con ACh como con CCK-8 son similares

y no difieren de manera estadísticamente significativa de las halladas con la estimulación en medio normal conteniendo Mg^{2+} . Este hecho indica que la $[Mg^{2+}]_o$ no presenta efectos sobre la $[Mg^{2+}]_i$ y, más aún, no parece estar asociada con las respuestas observadas en la $[Mg^{2+}]_i$ en respuesta a los secretagogos. Este Mg^{2+} probablemente es liberado desde un depósito intracelular que podría incluir a la mitocondria (Romani y cols., 1992) o ligandos cargados negativamente como ARN, ATP ADP, citrato o enzimas activadas por Mg^{2+} (Günther, 1990; Cowan, 1991).

Es necesario destacar que la elevación observada en la $[Mg^{2+}]_i$ tras la estimulación con los secretagogos no es debida a la combinación del Ca^{2+} intracelular con el indicador mag-fura-2, ya que las respuestas se observan solamente a 37 °C y no a temperatura ambiente (Lennard y Singh, 1991; 1992). Datos apoyando esta conclusión son los que Wisdom y cols. (1995) describen en sus ensayos en los que la estimulación con ionomicina o tapsigargina de acinos pancreáticos cargados con este indicador en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular conduce a una disminución en la $[Mg^{2+}]_i$, mientras que cuando los acinos pancreáticos están cargados con fura-2 estos agentes conducen a un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$.

A pesar de estos resultados es necesario prestar cierta atención a la posibilidad de unión del mag-fura-2 al ion Ca^{2+} , especialmente cuando grandes incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ están teniendo lugar, ya que estudios realizados por otros autores han demostrado que los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ pueden interferir con las señales emitidas por el indicador mag-fura-2 cuando se pretende medir Mg^{2+} (Hurley y cols., 1992). Estos autores han descrito que la saturación de la molécula de mag-fura-2 con Ca^{2+} o con Mg^{2+} produce cambios equivalentes en la fluorescencia emitida por la molécula del indicador; sin embargo coinciden con nosotros en que únicamente cuando los cambios que se están produciendo en la $[Ca^{2+}]_i$ son realmente elevados es cuando podríamos encontrar interferencias en la determinación de la $[Mg^{2+}]_i$. Nuestros resultados experimentales muestran que la K_d del mag-fura-2 para el ion Ca^{2+} es de 15'35 μM ; mientras que Hurley y cols. dan un valor de 20'49 μM y hacen referencia a que otros autores han encontrado valores de entre 44 y 60 μM , de manera que, teniendo en cuenta que la $[Ca^{2+}]_i$ raramente sobrepasa el valor de 1 μM durante la estimulación, es posible

descartar una posible interferencia del ion Ca^{2+} en nuestras determinaciones de la $[\text{Mg}^{2+}]$.

5.2.- Experimentos en células asiladas.

5.2.1- Efecto de la CCK-8 y la ACh sobre el pH_i .

Nuestros resultados demuestran claramente que los secretagogos CCK-8 y ACh inducen una acidificación seguida de una lenta recuperación hacia los valores basales. Esta acidificación es dependiente de la dosis y presenta valores más acusados en el caso de la CCK-8.

En general puede decirse que esta acidificación transitoria es un rasgo común para los mensajeros extracelulares movilizados de Ca^{2+} en numerosos tipos celulares (Ives y Daniel, 1987; Tsunoda y cols., 1991). Sin embargo, a diferencia de lo descrito por Muallem y Loessberg (1990b), y por otros autores, que encuentran una clara recuperación del pH_i incluso hasta valores superiores al basal, en nuestro caso, la recuperación del pH_i tras la acidificación inicial es lenta y, en ocasiones, incompleta, al menos dentro del período de tiempo empleado en nuestros experimentos. La respuesta que nosotros hemos detectado es similar también a la descrita para otros agonistas, como por ejemplo la insulina en hepatocitos (Haimovici y cols., 1994).

Varias líneas de evidencia sugieren que, al menos en las células acinares del páncreas, los agonistas estudiados producen una acidificación intracelular por un mecanismo relacionado con la movilización de Ca^{2+} intracelular. En primer lugar, la CCK-8 también produce una acidificación en medio libre de Ca^{2+} , situación en la que los agonistas no activan la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Esto indica que la acidificación es sólo parcialmente independiente de esta entrada de Ca^{2+} .

En segundo lugar, las diversas maniobras empleadas por nosotros, y que conducen a un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ van acompañadas, en mayor o menor grado, de una acidificación. Aunque en el caso del tratamiento con ionomicina este resultado sea de difícil interpretación (pues la ionomicina también transporta protones y podría acidificar el citosol por liberar protones desde los orgánulos intracelulares), en ausencia de Ca^{2+} extracelular (situación en la que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es menor) la acidificación

también es inferior a la obtenida con 1 mM de Ca^{2+} en el medio externo, sugiriendo que su efecto sobre el pH_i se debe básicamente a un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Pero tanto la aplicación de tapsigargina (que inhibe de forma irreversible la bomba Ca^{2+} -ATPasa microsomal), como el incremento en la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular inducido por vaciamiento previo de los depósitos citoplasmáticos, maniobras que incrementan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, provocan una acidificación citoplasmática sólo explicable por las concentraciones del ion y no por otros mecanismos como pudieran ser la activación de la PLC o la generación de otros mensajeros intracelulares distintos al Ca^{2+} . Por lo tanto podemos aceptar que la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es suficiente para acidificar las células acinares pancreáticas.

Esta tesis se ve reforzada por el hecho de que la CCK-8 necesita movilizar Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares no mitocondriales para inducir esta acidificación. De hecho, en ningún caso hubo reducción en el pH_i en respuesta a la CCK-8 cuando las células habían sido previamente tratadas con tapsigargina o CPZ, porque los depósitos estaban vacíos y los experimentos se realizaron en medio libre de Ca^{2+} .

Sin embargo Muallem y Loessberg (1990) indican que la acidificación por CCK-8 no se afecta ante el pretratamiento con bajas concentraciones de ionomicina, que según estos autores vacía los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . No es fácil dar una explicación para esta discrepancia. Una posibilidad es que la ionomicina altere de alguna manera la distribución subcelular de protones, lo que podría ya de por sí cambiar el pH_i . En cualquier caso, como ya hemos comentado anteriormente, la capacidad de la ionomicina para actuar como un protonóforo desaconseja su empleo en estudios de pH_i .

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores que han encontrado que la acidificación en respuesta a la ionomicina y otros agentes movilizadores de Ca^{2+} resulta abolida si se tampona la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Ives y Daniel, 1987). Por otro lado, Kimura y cols. (1990) han demostrado que el Ca^{2+} citosólico es un requisito para que los agonistas, que como la vasopresina o la trombina producen acidificación inicial seguida de alcalinización, puedan activar el intercambio Na^+/H^+ , indicando una estrecha relación Ca^{2+} - pH_i y postulando que el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que producen ciertos agonistas contribuye a la alcalinización, vía intercambio Na^+/H^+ .

De lo discutido hasta aquí se deduce que la CCK-8 acidifica las células con el concurso necesario de un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, aumento que “per se” es capaz de reducir el pH_i , aunque no sea necesariamente el único mensajero activado por la hormona que produzca esa acidificación.

Una posible explicación al fenómeno descrito es que durante la aplicación de la CCK-8 o la ACh (o de cualquier tratamiento que aumente la $[Ca^{2+}]_i$) la activación de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) genere un intercambio Ca^{2+}/H^+ , como han descrito Dougirdas y cols. (1995) y Kimura y cols. (1990). Para comprobar esto, realizamos experimentos en los que la actividad de la PMCA estaba reducida con lo que si la acidificación se debe en parte a la propiedad de esta bomba de intercambiar protones por Ca^{2+} , la CCK-8 debería producir una respuesta menor. En efecto esto es lo que se observa, sin que por ello podamos excluir la existencia de otros mecanismos que colaboren en el cambio de pH_i en respuesta a la CCK-8 y ACh. Otro dato que refuerza esta relación PMCA/ pH_i es la observación en nuestro laboratorio (datos no mostrados en esta memoria), y por otros autores (Kimura y cols., 1990; Lax y cols., 1994), de que al pasar las células de un medio con Ca^{2+} a un medio libre del ion, el pH_i sufre una ligera disminución, o lo que es lo mismo la reducción de la $[Ca^{2+}]_o$ permitiría una cierta “aceleración” de la actividad de la PMCA.

Aunque Muallem y Loessberg (1990) descartan este intercambio, basándose en que las células acinares no movilizan suficiente Ca^{2+} para explicar el acúmulo de H^+ , lo cierto es que para una acidificación de hasta 0'1 unidades de pH con un pH_i basal de 7'2 ($\Delta H = 0'1$) y asumiendo una capacidad de tamponamiento celular de 10-20 (mM/unidad de pH), el aumento neto de $[H^+]$ es de 1-2 mM, que es cercano a la cantidad de Ca^{2+} movilizado y transportado al medio externo por los agonistas (Tepikin, 1992a), incluso asumiendo que el intercambio sigue una estequiometría 1:1 y no 1:2.

Otra posibilidad es que la CCK-8 inhiba transitoriamente el intercambiador Na^+/H^+ , único de los sistemas descritos de control del pH_i en estas células que se encuentra activo en ausencia de HCO_3^- en el medio extracelular (Muallem y Loessberg, 1990). Tal inhibición podría ser directa o consecuencia de un incremento en la concentración intracelular de Na^+ , por apertura de canales catiónicos de membrana

(Petersen, 1992). De ser así, el bloqueo previo de este antitransporte anularía la reducción del pH_i en respuesta a la CCK-8. Si bien esto es lo que sucede en nuestros experimentos con NMDG, al eliminar el Na^+ del medio externo el antitransporte no solamente se inhibe sino que se invierte (intercambiando Na^+ intracelular por H^+ extracelulares) y el pH_i disminuye hasta niveles que quizás no permitan una respuesta posterior a la CCK-8. Cuando comprobamos ésto, acidificando las células mediante la reducción del pH_o hasta 7, obtenemos también una menor respuesta a la CCK-8. Incluso la administración de CCK-8 durante la fase ácida que sigue a un pulso de NH_4Cl no produce cambios en la recuperación del pH_i . Como está bien establecido que esta recuperación, en ausencia de HCO_3^- externo, es debida a la actividad del intercambiador Na^+/H^+ , si la CCK-8 lo inhibe transitoriamente esto debería cambiar el perfil de la alcalinización, cosa que no sucede. De lo anterior se desprende que si el pH_i es lo suficientemente bajo, la CCK-8 no acidifica las células acinares del páncreas a pesar de ser capaz de liberar Ca^{2+} desde los depósitos normalmente, como indican nuestros resultados (ver figura 38, en resultados). Nuevamente discrepamos con Muallem y Loessberg (1990), quienes indican que en ausencia de Na^+ en el medio extracelular la CCK-8 no pierde su capacidad de reducir el pH_i .

Junto con la movilización de Ca^{2+} , es bien conocido que la CCK-8 y la ACh aumentan la actividad de la PKC. Esta enzima es un factor activador del intercambio Na^+/H^+ en numerosos tipos celulares (ver Frelin y cols., 1988), incluyendo las células acinares pancreáticas (Bastie y cols., 1988). Por tanto no parece probable que la PKC sea responsable de la acidificación, al menos de una manera directa. De hecho nuestros resultados demuestran que la aplicación del activador de la PKC, el TPA, no induce acidificación. Al emplear inhibidores de esta enzima, como el GFX y la chelitrina, se produce una acidificación, la cual sugiere un posible efecto tónico de la PK sobre el pH_i , muy probablemente vía intercambiador Na^+/H^+ . Tanto la aplicación de TPA como la inhibición de la PKC, reducen la acidificación provocada por CCK-8. Aunque esto pueda parecer una contradicción, creemos que no es así, debido a que: a) parte de la acidificación se debe probablemente a una activación generalizada celular por la PKC y b) el pretratamiento con TPA inhibe la movilización de Ca^{2+} en células acinares de rata.

Kimura y cols. (1990) también hallaron resultados parecidos al aplicar TPA y estaurosporina (un inhibidor de la PKC) en plaquetas, al estudiar la activación del intercambiador Na^+/H^+ debida a la acidificación citoplasmática. Estos autores lo explicaron aduciendo que la PKC actúa normalmente además de activando el intercambiador Na^+/H^+ , como retroinhibición negativa de la señal de Ca^{2+} (que lo activa aún más), con lo que el inhibidor acentúa el efecto del Ca^{2+} (por facilitar su movilización) y el TPA estimula directamente la actividad del intercambiador. En nuestro caso, independientemente del efecto sobre el pH_i basal, podemos estar en una situación análoga pero centrada en la acidificación inicial: la PKC participa en la acidificación (por eso el GFX reduce la respuesta de pH_i a la CCK-8) pero puede reducirla al inhibir la señal de Ca^{2+} (por eso el TPA también reduce la respuesta). De hecho, se sabe que en las células la movilización de Ca^{2+} puede ser reducida al emplear TPA, y además la actividad de la PMCA se incrementa por estimulación de la PKC (Arita y cols., 1990; ver Tsunoda, 1993).

Las células acinares sufren una reducción de volumen al ser estimuladas por secretagogos (Petersen, 1992), de manera que deben responder con un aumento de volumen compensador o RVI (Lang y cols., 1995). En todos estos mecanismos, aún bastante oscuros, el transporte de H^+ podría tener un papel importante que explicase la reducción de pH_i . El intercambio Na^+/H^+ es activado al reducirse el volumen celular, conduciendo a la captación de Na^+ y cooperando en el RVI. Aunque no se sabe cual es el mecanismo para tal activación, es posible que una reducción inicial del volumen contribuya a ello, mediante una disminución del pH_i . De hecho nuestros resultados muestran que la perfusión con un medio hipertónico puede reproducir en cierta medida la acidificación producida por la CCK-8. Esto sugiere que la mera activación de la célula, de ir acompañada de cambio de volumen, conduce a la acidificación inicial.

Otro fenómeno que acompaña a la activación celular por secretagogos es la despolarización de la membrana plasmática. En nuestros experimentos, una despolarización producida por la presencia de 50 mM de ClK en el medio de perfusión no produjo cambios en el pH_i , como era de esperar por otra parte si este posible efecto se debe tan solo al mero cambio del potencial electroquímico para el ion H^+ .

Aunque creemos que una parte de la acidificación es producto del intercambio $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ por la activación de la PMCA cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es aumentada por la CCK-8 o la ACh, es probable que una parte de esta acidificación sea (descartada la inhibición del intercambio Na^+/H^+) consecuencia de la producción de equivalentes ácidos en algún punto del citoplasma.

De hecho, en las condiciones en que hemos realizado nuestros experimentos no es de esperar que realmente la CCK-8 actúe disminuyendo o retirando equivalentes básicos (como HCO_3^-), por lo que todo apunta a que tenga lugar una producción neta de protones. En células intestinales, IEC-6 Sjaastad y cols. (1992) han demostrado que incluso en en situación de reposo la producción o liberación de H^+ es bastante elevada, que tendría un origen citosólico o bien en la presencia de un canal o intercambiador de H^+ .

Un simple aumento del metabolismo celular incrementaría la fosforilación oxidativa y el transporte de H^+ por las mitocondrias. Teniendo en cuenta que en las células acinares pancreáticas el volumen mitocondrial total es aproximadamente un 8% de la matriz citosólica (Bolander, 1974), para que se produzca una acidificación de 0'07 unidades de pH en el citosol a expensas del transporte mitocondrial de H^+ , en la matriz de las mitocondrias sería posible una alcalinización de hasta 0'46 unidades de pH. En estudios con mitocondrias aisladas se han descrito alcalinizaciones de hasta 0'3 unidades de pH, al aumentar su actividad (Campo y Tedeschi, 1984). Si bien, teóricamente hablando, es difícil que el aumento de la actividad mitocondrial sea el principal origen de la carga ácida, y no teniendo datos que permitan saber hasta qué punto los secretagogos incrementan la actividad mitocondrial, no sería improbable que la actividad mitocondrial sea un factor más implicado en la acidificación provocada por CCK-8. Además, el estímulo metabólico puede, de todos modos, generar carga ácida por producción de metabolitos como piruvato y lactato.

En neuronas de caracol se produce una acidificación en respuesta a la inyección de Ca^{2+} que es bloqueada por inhibidores mitocondriales. En estos resultados se basa la hipótesis de que el ion Ca^{2+} se intercambia por H^+ intramitocondriales (ver Roos y Boron, 1981). Más específicamente, en células acinares pancreáticas se ha descrito captación de Ca^{2+} por las mitocondrias, sobretodo al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta valores

próximos a 1 μM (Toescu y cols., 1993). Por todo ello, aunque creemos que se trata de un factor secundario, no podemos excluir la posibilidad de que la función mitocondrial participe de los procesos acidificadores encontrados.

En resumen, nuestros datos demuestran que la CCK-8 induce una acidificación transitoria desencadenada basicamente por la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, cooperando en esto la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.

5.2.2.- Efecto de las modificaciones del pH_i sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Los sistemas de acumulación de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares y, probablemente, las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependen de la existencia de gradientes de pH subcelulares (Schulz y cols., 1989). De ser cierta esta hipótesis, la modificación experimental del pH_i debe afectar profundamente al patrón oscilatorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ detectable en las células acinares durante su estimulación con concentraciones fisiológicas de CCK-8.

Efectivamente, nuestros resultados indican que los mecanismos de generación de oscilaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células acinares del páncreas exocrino de la rata implican la existencia de gradientes intracelulares de pH y/ o el transporte de protones.

Tanto la aplicación de propionato como de NH_4Cl muestran efectos coincidentes sobre las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$: durante la alcalinización se produce un bloqueo de las oscilaciones, mientras que durante la acidificación hay una liberación inicial de Ca^{2+} seguida de una inhibición mayoritaria de las oscilaciones. Sin embargo, la perfusión con un medio libre de Na^+ (que fue sustituido por NMDG) sólo afecta a las oscilaciones cuando las células disponen nuevamente de Na^+ extracelular. Puesto que las tres maniobras experimentales acidifican la célula, el diferente comportamiento de las oscilaciones revela que sólo una acidificación del citosol (efecto del NMDG al revertirse el intercambiador Na^+/H^+) no es suficiente para la inhibición de las oscilaciones, mientras que propionato y NH_4Cl , que difunden con facilidad a través de todas las membranas celulares y modifican tanto el pH citosólico como como el de los orgánulos intracelulares, las bloquean. Por tanto las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidas

por CCK-8 sólo se mantienen si existe un gradiente de pH entre citoplasma y orgánulos o depósitos intracelulares.

Pero las oscilaciones de Ca^{2+} en células que no poseen canales de Ca^{2+} activados por voltaje, ni directamente por el receptor, como es el caso de las células del páncreas, dependen además del gradiente de pH, de la interrelación entre distintas bombas y canales que transportan este ion (Petersen, 1992).

El bloqueo de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular puede reducir lentamente las oscilaciones de Ca^{2+} en las células acinares pancreáticas (Tsunoda, 1990), debido a un progresivo vaciamiento de los depósitos intracelulares, ya que con cada oscilación las células expulsan una cantidad de Ca^{2+} al medio extracelular (Tepikin y cols., 1992b). Aunque algunos autores han propuesto que la alcalinización con NH_4Cl inhibe la entrada de Ca^{2+} (ver la revisión de Tsunoda de 1993), lo mismo que ocurre con la acidificación del medio extracelular (Muallem y cols., 1989), con nuestros experimentos se demuestra claramente que la alcalinización intracelular no reduce la entrada de Ca^{2+} . Por tanto, a pesar de que hay una aparente reducción del “influx”, ésta es realmente reflejo del efecto del pH_i sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Además, la privación de Ca^{2+} extracelular actúa inhibiendo las oscilaciones en las células acinares del páncreas de modo lento y, con frecuencia, incompleto (Tepikin y cols., 1992b; Tsunoda, 1990), a diferencia de la inhibición rápida y absoluta que nosotros hemos encontrado. Por tanto no es probable que el efecto de NH_4Cl y del propionato se deba a una reducción del “influx” de Ca^{2+} .

En cuanto a un posible efecto sobre la extrusión de Ca^{2+} hacia el medio externo, de ser inhibida por los protones citosólicos, el resultado sería un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al reducirse el pH citoplasmático, con una mayor amplitud de las oscilaciones, mientras que éstas se reducirían al alcalinizarse el citoplasma pero no llegando a abolirse, hechos que no se ven confirmados por nuestros resultados. Esto deja tan solo el transporte de Ca^{2+} a través de las membranas intracelulares o la capacidad de tamponamiento de Ca^{2+} como posibles puntos de acción de la alcalinización intracelular.

En las células acinares del páncreas y de glándula parótida de rata se ha demostrado que el mecanismo por el que los depósitos intracelulares sensibles al IP_3 captan Ca^{2+} citoplasmático, una Ca^{2+} -ATPasa dependiente de Mg^{2+} , funciona intercambiando Ca^{2+} citosólico por H^+ , que serán recaptados mediante una H^+ -ATPasa vacuolar dependiente de Mg^{2+} (Schulz y cols., 1989). Por tanto, de bloquearse o reducirse el gradiente de H^+ en el interior del retículo (que es el punto intracelular propuesto como depósito del Ca^{2+} movilizado en este tipo de oscilaciones que nos ocupa) es de esperar un defecto en la captación de Ca^{2+} . Esta captación es muy importante en el patrón oscilatorio normal observado en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a los agonistas, como se ha demostrado también al aplicar concentraciones submáximas del inhibidor de esta bomba, la tapsigargina (Petersen y cols., 1993).

Nuestros resultados podrían explicarse si existiera un bloqueo de la recarga acompañado de una rápida extrusión a través de la bomba de Ca^{2+} situada en la membrana celular y/o el tamponamiento de los iones Ca^{2+} por unión inespecífica, al reducirse drásticamente la concentración de H^+ . Una alternativa, más complicada, es que la alcalinización, al anular la acidez en el interior de los depósitos de Ca^{2+} , reduzca la fusión de vesículas o compartimentos, fenómeno activado en el páncreas por el GTP de un modo dependiente de la acidificación intravesicular (Hampe y cols., 1990) que es una de las teorías para explicar la movilización de Ca^{2+} desde el depósito insensible al IP_3 tras la activación del sensible (Schulz y cols., 1989).

Por otra parte, Tsunoda y cols. (1991) han propuesto que la liberación de Ca^{2+} desde el depósito produce un flujo de H^+ en sentido opuesto al movimiento de Ca^{2+} , para compensar la electroneutralidad, de manera que las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ se acompañarían de oscilaciones en el gradiente de pH entre citosol y depósito de Ca^{2+} , y cooperarían en cada liberación de Ca^{2+} . Por supuesto la alcalinización interna inhibiría este mecanismo oscilatorio. La acidificación, sin embargo, sólo produciría el efecto de reducir el gradiente de pH intracelular, inhibiendo las oscilaciones e incluso liberando Ca^{2+} de los depósitos, como de hecho encontramos. Sin embargo, el NMDG no actúa así, por lo que es más probable que este modelo no sea totalmente correcto. Coincidimos con Tsunoda en la intervención de gradientes de pH en los ciclos de Ca^{2+} (aunque no necesariamente mediante oscilaciones de este gradiente) pero la sola

acidificación citosólica no es, a la luz de nuestros datos, causa suficiente para la liberación de Ca^{2+} desde el depósito (aunque contribuya a ello como indica la aparición de algunas espigas en células que no oscilaban y en una minoría de células que sí lo hacían -ver resultados-). Es la acidificación conseguida con propionato o tras NH_4Cl la que realmente es efectiva aumentando la liberación de Ca^{2+} , y puesto que en nuestros experimentos no es de intensidad mayor que la lograda con NMDG, debe implicar algún orgánulo citoplasmático. Sin embargo, no disponemos de ningún dato que pueda explicar este comportamiento a no ser la transfencia de Ca^{2+} al depósito sensible a IP_3 descrita con anterioridad (ver más arriba). Esto debería inhibir hasta cierto punto las oscilaciones sin llegar a abolirlas totalmente, que es precisamente el patrón observado en presencia de propionato (y, en menor medida, al retirar el NH_4Cl).

Por último, la reentrada de Na^+ al retirar el NMDG inhibe las oscilaciones en un alto porcentaje de las células, coincidiendo con la recuperación del pH_i hacia niveles basales (pero sin que se llegue a establecer en ese período una alcalinización), mediante la reactivación del intercambio de Na^+ extracelular por H^+ intracelulares. Asumiendo que básicamente este cambio de pH_i afecta al citosol, la reducción observada en las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sólo puede explicarse si, además de los gradientes de pH en el medio intracelular y del flujo de H^+ en relación con el Ca^{2+} mencionados más arriba, alguno de los sistemas de transporte de Ca^{2+} se “adaptase” durante la acidificación (en ausencia de Na^+) y resultase inhibido al reducirse la $[\text{H}^+]$ (presencia de Na^+ externo). Sin embargo, no disponemos de datos que permitan discutir esta posibilidad, aunque se ha propuesto que la liberación de Ca^{2+} desde el depósito insensible a IP_3 puede ser inhibida por protones (Schulz y cols., 1989). Como hemos indicado antes, esto requeriría por tanto que este depósito sea un factor activo y necesario en las oscilaciones, lo que coincide con lo descrito por distintos autores (ver Petersen, 1992).

6.- CONCLUSIONES

- 1) Ni la histamina ni los agonistas 2-PEA, dimaprit y α -metilhistamina, en un rango de concentraciones de 10^{-5} M a 10^{-7} M, inducen variaciones detectables con los métodos empleados por nosotros en la concentración de Ca^{2+} libre citoplasmático de células acinares pancreáticas de rata. Los efectos secretores descritos por otros autores para la citada amina no se justifican pues por la activación de la señal intracelular de Ca^{2+} .
- 2) Tanto la CCK-8 como la ACh inducen no sólo aumentos en la concentración de Ca^{2+} intracelular, sino además cambios en la homeostasis del ion Mg^{2+} independientes de la concentración de este último en el medio extracelular, lo que podría suponer un hecho importante en los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción en las células acinares pancreáticas de rata.
- 3) Los agonistas movilizados de Ca^{2+} , ACh y CCK-8, producen una acidificación transitoria en las células acinares pancreáticas de rata, acidificación dependiente de la movilización del Ca^{2+} acumulado en los depósitos intracelulares y parcialmente dependiente de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.
- 4) Al menos una parte de la acidificación ocasionada por estos secretagogos se debe a la extrusión de Ca^{2+} mediante la bomba situada en la membrana plasmática.
- 5) Los mecanismos de generación de las oscilaciones de Ca^{2+} por concentraciones fisiológicas de CCK-8, necesitan de la existencia de un pH_i estable y de gradientes intracelulares de pH.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Abrahamse, S.L.; Vis, A.; Bindels, R.J.M. y Van Os, C.H. (1994) Regulation of intracellular pH in crypt cells from rabbit distal colon. *Am. J. Physiol.* 267, G409-G415.

Addanki, S.; Cahill, F.D. y Sotos, J.F. (1968) Determination on intramitochondrial-extramitochondrial pH gradient of isolated heart mitochondria by the use of 5,5-dimethyl-2,2-oxazolidinedione. *J. Biol. Chem.* 243, 2337-2348.

Adelson, J.W. y Rothman, S.S. (1975) Chymodenin, a duodenal peptide: specific stimulation of chymotrypsinogen secretion. *Am. J. Physiol.* 229, 1680-1686.

Agullo, L.; Picatoste, F. y Garcia, A. (1990) Histamine stimulation of cyclic AMP accumulation in astrocyte-enriched and neuronal primary cultures from rat brain. *J. Neurochem.* 55, 1592-1598.

Agus, Z.S.; Kelepouris, E.; Dukes, I. y Morad, M. (1989) Cytosolic magnesium modulates calcium channel activity in mammalian ventricular cells. *Am. J. Physiol.* 256, C452-C455.

Aickin, C.C. y Thomas, C. (1977) An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibers. *J. Physiol. Lond.* 273, 295-316.

Akao, S.; Bockman, D.E.; Lechene de la Porte, P. y Sarles, H. (1986) Three dimensional pattern of ductuloacinar associations in normal and pathological human pancreas. *Gastroenterology.* 90, 661-668.

Akiba, T.; Rocco, V.K. y Warnock, D.G. (1987) Parallel adaptation of the rabbit renal cortical sodium/proton antiporter and sodium/bicarbonate cotransporter in metabolic acidosis and alkalosis. *J. Clin. Invest.* 80, 308-315.

Al-Awqati, Q. (1978) H⁺ transport in urinary epithelia. *Am. J. Physiol.* 235 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 4), F77-F86.

Alcon, S.; Pozo, M.J.; Salido, G.M. y Pariente, J.A. (1995) Histaminergic modulation of hormonal control in the exocrine guinea-pig pancreas. *Inflamm. Res.* 44, 207-211.

Alper, S.L. (1991) The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu.Rev.Physiol.* 53, 549-564.

Altura, B.M. y Altura, B.T. (1995) Magnesium in cardiovascular biology. *Scientific American* May/Jun issue, 28-37.

Alvarez-Leefmans, F.J.; Giraldez, F. y Gamino, S.M. (1987) Intracellular free magnesium in excitable cells: its measurement and its biologic significance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 915-925.

Amsterdam, A. y Jamieson, J.D. (1972) Structural and functional characterization of isolated pancreatic exocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 3028-3032.

Ansah, T.-A.; Molla, A. y Katz, S. (1984) Ca²⁺-ATPase activity in pancreatic acinar plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259, 13442-13450.

Argent, B. E.; Smith, R. K. y Case, R. M. (1976). The role of calcium in pancreatic enzyme and electrolyte secretion. En: "Stimulus-secretion coupling in the gastrointestinal tract" Ed. Case y Goebell. MTP,Londres. pp:237-250.

Argent, B.E. y Case, R.M. (1994) Pancreatic ducts. Cellular mechanism and control of bicarbonate secretion En:"Physiology of the gastrointestinal tract" Ed:Johnson, L.R. Raven Press, New York. pp. 1473-1497.

Arita, Y.; Kimura, T.; Yazu, T.; Ogami, Y. y Nawata, H. (1991) Effects of H7 and staurosporine on cytosolic free calcium and amylase secretion in rat pancreatic acini. *Pancreas* 6: 112-119.

Aronson, P.S. (1985) Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺/K⁺ exchanger. *Annu.Rev.Physiol.* 47, 545-560.

Aronson, P.S. y Igarashi, P. (1986) Molecular properties and physiological roles of the renal Na-H exchanger. *Curr. Top. Membr. Transp.* 26, 57-75.

Aronson, P.S.; Nee, J. y Suhm, M.A. (1982) Modifier role of internal Na⁺ inactivating the Na⁺/H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature London* 161, 161-163.

Ashton, N.; Argent, B.E. y Green, R. (1990) Effect of vasoactive intestinal polypeptide, bombesin and substance P on fluid secretion by isolated rat pancreatic ducts. *J. Physiol. Lond.* 427, 471-482.

Attwell, D. (1986) The physical chemistry of acid-base balance En: "Acid-base balance" Ed: Hainsworth, R. Manchester University Press, Manchester. pp. 1-26.

Baker, P.F. y Knight, D.E. (1978) Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. *Nature London* 276, 620-622.

Banschbach, M.W.; Geison, R.L. y Hokin-Neaverson, M. (1974) Acetylcholine increases the level of diglyceride in mouse pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 714-718.

Banschbach, M.W.; Geison, R.L. y Hokin-Neaverson, M. (1981) Effects of cholinergic stimulation on levels and fatty acids composition of diacylglycerols in mouse pancreas. *Biochim. Biophys. Acta.* 663, 34-45.

Banschbach, M.W. y Hokin-Neaverson, M. (1980) Acetylcholine promotes the synthesis of prostaglandin E in mouse pancreas. *FEBS. Lett.* 117, 131-133.

Bartley, W. y Amooore, J.E. (1958) The effects of manganese on the solute content of rat-liver mitochondria. *Biochem. J.* 69: 348-360.

Bastie, M.J.; Delvaux, M.; Dufresne, M.; Saunier-Blache, J.S.; Vayse, N. y Ribet, A. (1988) Distinct activation of Na⁺-H⁺ exchange by gastrin and CCK peptide in acini from guinea pig. *Am. J. Physiol.* 254, G25-G32.

Bayerdorffer, E.; Eckhardt, L.; Haase, W. y Schulz, I. (1985) Electrogenic calcium transport in plasma membrane of rat pancreatic acinar cells. *J. Membr. Biol.* 84, 45-60.

Berridge, M.J. (1983) Rapid accumulation of inositol triphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem. J.* 212, 849-858.

Berridge, M.J. (1987) Inositol triphosphate and diacylglycerol two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 159-194.

Berridge, M. J. (1988) Inositol triphosphate-induced membrane potential oscillations in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.*, 403: 589-599.

Berridge, M. J. (1990) Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.*, 265: 9583-9586.

Berridge, M. J. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature London* 361, 315-325.

Berridge, M. J.; Cobbold, P. H. y Cuthbertson, K. S. R. (1988) Spatial and temporal aspects of cell signalling. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*, 320:325-343.

Berridge, M.J. y Gallione, A. (1988) Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J.* 2, 3074-3082.

Berridge, M. J. y Irvine, R. F. (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312: 315-321.

Berridge, M.J. y Irvine, R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature London* 341, 197-205.

Berridge, M.J. (1987) Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 159-193.

Bialojan, C. y Takai, A. (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem. J.* 256, 283-290.

Biden, T.J.; Wollheim, C.B. y Schlegel, W. (1986) Inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular Ca²⁺ homeostasis in clonal pituitary cells (GH3). *J. Biol. Chem.* 261, 7223-7229.

Birch, N.J. (1993): Magnesium and the cell. Academic Press, London.

Birnbaumer, L.; Codina, J.; Mattera, R.; Yatani, A.; Scherer, N.; Toro, M. J. y Brown, A. M. (1987) Signal transduction by G proteins. *Kidney International*, 32: S14-S37.

Birnbaumer, L. (1990) G-proteins in signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 675-705.

Bissonnette, B. M.; Collen, M. J.; Adachi, H.; Jensen, R. T. y Gardner, J. D. (1984) Receptor for vasoactive intestinal peptide and secretin on rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol.*, 246: G710-G717.

Bockman, D.E. (1986) Anatomy of the pancreas En: "The exocrine pancreas: biology, pathobiology and diseases" Ed:Go, V.L.W.; Gardner, J.D.; Brooks, F.P.; Lebenthal, E.; Dimagno, E.P. y Scheele, E. Raven Press, New York. pp. 1-7.

Bolander, R. P. (1974) Stereological analysis of the guinea pig pancreas. I. Analytical model and quantitative description of nonstimulated pancreatic exocrine cells. *J. Cell Biol.*, 61, 269-287.

Boron, W.F. (1986) Intracellular pH regulation in epithelial cells. *Annu.Rev.Physiol.* 48, 377-388.

Boron, W.F. y Boulapep, E.L. (1983) Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the Salamander: basolateral HCO_3^- transport. *J. Gen. Physiol.* 81: 53-94.

Boron, W.F.; McCormic, W.C. y Roos, A. (1979) pH regulation in barnacle muscle fibers dependence on intracellular and extracellular pH. *Am. J. Physiol.* 237 (Cell Physiol. 6), C185-C193.

Boron, W.F. y Russell, J.M. (1983) Stoichiometry and ion dependencies of the intracellular pH-regulating mechanism in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* 81, 373-399.

Bowman, E.J.; Siebers, A. y Altendorf, K. (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7972-7976.

Boynton, A. L.; Dean, N. M. y Hill, T. D. (1990) Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and regulation of intracellular calcium. *Biochem. Pharmacol.*, 40: 1933-1939.

Brockman, D.E. (1978) Anastomosing tubular arrangement of dog exocrine pancreas. *Cell. Tissue. Res.* 189, 497-500.

Brown, G.R.; Richardson, A.E. y Dormer, R.L. (1987) The role of a (Ca²⁺-Mg²⁺)ATPase of the rough endoplasmic reticulum in regulating intracellular Ca²⁺ during cholinergic stimulation of rat pancreatic acini. *Biochem. Biophysic. Acta.* 902, 87-92.

Brugge, W.R.; Burke, C.A.; Izzo, R.S. y Praissman, M. (1987) Role of cholecystokinin in intestinal phase of human pancreatic secretion. *Dig. Dis. Sci.* 32, 155-163.

Bruzzone, R. (1990) The molecular basis of enzyme secretion. *Gastroenterology.* 99, 1157-1176.

Bruzzone, R.; Trimble, E.R.; Gjinouci, A. y Renold, A.E. (1984) Glucose-insulin interactions on exocrine secretion from the perfused rat pancreas. *Gastroenterology.* 87, 1305-1312.

Bruzzone, R; Pozzan, T. y Wollheim, C.B. (1986) Caerulein and carbamylcholine stimulate pancreatic amylase release at resting cytosolic free Ca²⁺. *Biochem. J.* 235: 139-143.

Bundgaard, M.; Moller, M. y Poulsen, J.H. (1981) Localization of sodium pump sites in cat pancreas. *J. Physiol. Lond.* 313, 405-415.

Burgess, G.M.; McKidney, J.S.; Irvine, R.F. y Putney, J.W.J. (1985) Inositol-1,4,5-trisphosphate and inositol-1,3,4-trisphosphate formation in Ca^{2+} -mobilizing-hormone-activated cells. *Biochem. J.* 232, 237-243.

Burnham, D.B. (1985) Characterization of Ca^{2+} -activated protein phosphatase activity in exocrine pancreas. *Biochem. J.* 231, 335-341.

Burnham, D.B.; Munowitz, P.; Hootman, S.R. y Williams, J.A. (1986) Regulation of protein phosphorylation in pancreatic acini. *Biochem. J.* 235, 125-131.

Burnham, D.B.; Soling, H.-D. y Williams, J.A. (1988) Evaluation of myosin light chain phosphorylation in isolated pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 254, G130-G134.

Burnham, D.B. y Williams, J.A. (1982) Effectsof charbacol, cholecystokinin and insulin on protein phosphorylation in isolated pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* 257, 10523-10528.

Burnham, D.B. y Williams, J.A. (1984) Activation of protein kinase activity in pancreatic acini by calcium and cAMP. *Am. J. Physiol.* 246, G500-G508.

Burnham, D. B.; McChesney, J. M.; Thurston, K. C. y Williams, J. A. (1984) Interaction of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide on function of mouse pancreatic acini in vitro. *J. Physiol.*, 349:475-482.

Burnham, D. B.; Munowitz, P.; Thorn, N. y Williams, J. A. (1985) Protein kinase activity associated with pancreatic zymogen granules. *Biochem. J.*, 227: 743-751.

Buytendijk, F.J.J. y Woederman, M.W. (1927) Die physico-chemischen Erscheinungen wahrend der Entwicklung. I. Die Messung der Wasserstopffionenkonzentration. *Wilhem. Rous. Arch. Enticicklungsmech. Org* 112, 387-410.

Camello, P. J.; Gardner, J.; Petersen, O. H. y Tepikin, A. E. (1996) Calcium dependence of calcium extrusion and calcium uptake in mouse pancreatic acinar cells. *J. Physiol. London.* 490 (3), 585-593.

Camello, P.J. y Salido, G.M. (1993) Inhibitory interactions between stimulus-secretion pathways in the exocrine rat pancreas. *Biochemical Pharmacology* 46, 1005-1009.

Camello, P.J.; Wisdom, D.; Singh, J. y Salido, G.M. (1993) Effect of phorbol ester on vagal stimulation and acetylcholine-evoked exocrine pancreatic secretion and cytosolic free calcium in the rat. *Archiv. Int. de Physiol. Biochim. Biophys.* 101, 133-139.

Camello, P.J.; Wisdom, D.M.; Singh, J. y Salido, G.M. (1994) Hormonal control of exocrine pancreatic secretion in the isolated intact rat pancreas. *Rev. Esp. Fisiol.* 50 (1), 35-40.

Campo, M. L. y Tedeschi, H. (1984). Promotive force in giant mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 141, 5-7.

Canalis, E. (1992) Growth factors and their potential clinical value. *J. Clin. Endocr. Metab.* 75: 1-4.

Cannon, C.; Van Adelsberg, J.; Kelly, S. y Al-Awqati, Q. (1985) Carbondioxide-induced exocytotic insertion of H⁺ pump in turtle-bladder luminal membrane: role of cell pH and calcium. *Nature London* 314, 443-446.

Capurro, D.E. y Dormer, R.L. (1989) Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from endoplasmic reticular membranes of rat pancreas. *Digestion.* 43, 37.

Case, R. M. (1978) Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. *Biol. Rev.*, 53: 211-354.

Case, R.M. (1984) The role of Ca²⁺ stores in secretion. *Cell. Calcium.* 5, 89-110.

Case, R. M. y Argent, B. E. (1989). Pancreatic secretion of electrolytes and water. En: "Handbook of Physiology. Section 6: The gastrointestinal system. Vol. III. Salivary, gastric, pancreatic, and hepatobiliary secretion" Ed. Schultz, Forte y Rauner. American Physiological Society, Bethesda, Maryland. pp:383-417.

Carafoli, E. (1991). Calcium pump of the plasma membrane. *Physiological Reviews.*, 71, 129-153.

Catt, K. J. y Balla, T. (1989) Phosphoinositide metabolism and hormone action. *Ann. Rev. Med.*, 40: 487-509.

Cenatiempo, Y.; Mangeat, P. y Marchis-Mouren, G. (1975) Purification and properties of cyclic AMP dependent and independent protein kinases from rat pancreas. *Biochimie* 57, 865-873.

Chafouleas, J.G.; Lagace, L.; Bolton, W.E.; Boyd, A.E. y Means, A.R. (1984) Changes in calmodulin and its mRNA accompany reentry of quiescent (G0) cells into the cell cycle. *Cell* 36: 73-81.

Chance, B. (1965) The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 240, 2729-2748.

Chandler, W. K.; Rakowski, R. F. y Schneider, M. F. (1976) A non-linear voltage-dependent charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, 254: 245-283.

Chandrasekar, B. y Korc, M. (1991) Basic fibroblast growth factor is a calcium-mobilizing secretagogue in rat pancreatic acini. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 166-170.

Chaundhry, A.; Thompson, R.H.; Rubin, R.P. y Laychock, S.G. (1988) Relationship between delta-9-tetrahydrocannabinol-induced arachidonic acid release and secretagogue-evoked phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization of exocrine pancreas. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 34, 543-548.

Cheret, A.M.; Scarpignato, C.; Lewin, M.J.M. y Bertaccini, G. (1984) Inhibition of histamine-stimulated adenylate-cyclase activity of the guinea-pig gastric cells by the H₂-receptor antagonists cimetidine, ometidine and SKF 93479. *Pharmacology* 28, 268-274.

Chey, W. Y. (1986). Hormonal control of pancreatic exocrine secretion. En: "The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology, and Diseases" Ed. Go, Brooks, DiMagno, Gardner, Lebenthal y Scheele. Raven Press, New York. pp:301-313.

Christophe, J.P.; Frandsen, E.K.; Conlon, T.P.; Krishna, G. y Gardner, J.D. (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.

Clapham, D.E. (1993) A mysterious new influx factor? *Nature London* 364, 763-764.

Clemente, F. y Meldolesi, J. (1975) Calcium and pancreatic secretion. I. Subcellular distribution of calcium and magnesium in the exocrine pancreas of the guinea pig. *J. Cell. Biol.* 65(1), 88-102.

Cockroft, S. y Stutchfield, J. (1988) G-proteins, the inositol lipid signaling pathway and secretion. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 320, 247-265.

Cockroft, S. (1987) Polyphosphoinositide phosphodiesterase: regulation by a novel guanine nucleotide binding protein, Gp. *TIBS* 12, 75-78.

Cohen, P. (1985) The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* 151, 439-448.

Cohen, P. y Cohen, P.T. (1989) Protein phosphatases come of age. *J. Biol. Chem.* 264, 21435-21438.

Collen, M. J.; Sutliff, V. E.; Pan, G. Z. y Gardner, J. D. (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.

Copenhavaer, W.M.; Kelly, D.E. y Wood, R.L. (1978) The pancreas En: "Bailey's textbook of histology" Ed: Copenhaver, W.M. y Kelly, D.J. Williams & Wilkins, . pp. 521-526.

Corkey, B.E.; Duszyński, J.; Rich, T.L.; Matschinsky, B. y Williamson, J.R. (1986) Regulation of free and bound magnesium in rat hepatocytes and isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261, 2567-2574.

Counillon, L.A.; Franchini, A. y Pouyssegur, J. (1993) A point modulation of the Na^+/H^+ exchanger gene (NHE1) and amplification of the mutated allele confer amiloride resistance upon chronic acidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4508-4512.

Cowan, J.A. (1991) Metallobiochemistry of magnesium. Coordination complexes with biological substrates: site specificity, kinetics, and thermodynamics of binding and implications for activity. *Inorg.Chem.* 30, 2740-2747.

Creese, R. (1950) Bicarbonate ion and striated muscle. *J. Physiol. Lond.* 100, 450-457.

Curry, D.C.; Joy, R.M.; Holley, D.C. y Bennett, L. (1977) Magnesium modulation of glucose induced insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology.* 101(1), 203-208.

Daugirdas, J. T.; Arrieta, J.; Ye, M.; Flores, G. y Battle, D. C. (1995) Intracellular acidification associated with changes in free cytosolic calcium. Evidence for $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchange via a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 95 (4), 1480-1489.

Danforth, W.H. (1965) Activation of glycolytic pathway in muscle. En: "Control of energy metabolism" Ed: Cahnce, R.; Estabrook, W. y Williamson, J.B. Academic., New York. pp. 287-298.

Debas, H.T. y Yamagishi, Y. (1978) Evidence for pyloropancreatic reflex for pancreatic exocrine secretion. *Am. J. Physiol.* 234, E468-E471.

De Dios, I.; Calvo, J. J.; San Roman, J. I.; Plaza, M. A. y Lopez, M. A. (1987) Effect of isoproterenol on exocrine pancreatic secretion in the rabbit. *Med. Sci. Res.*, 15: 979.

Delvaux, M.; Bastie, M.J.; Chentuofi, J.; Ribet, A. y Vaysse, N. (1990) Na⁺/H⁺ exchange in AR4-2J cells: stimulation by growth factors and pancreatic secretagogues. *Digestion*. 46, 156-161.

Deschodt-Lankman, M.; Robberecht, P.; De Neef, P.; Lammens, M. y Christophe, J. (1976) In vitro action of bombesin and bombesin-like peptides on amylase secretion, calcium efflux and adenylate cyclase activity in the rat pancreas. *J. Clin. Invest.* 58, 891-898.

De Vries, H. (1871) Sur la permeabilite du protoplasma des Betteraves rouges. *Arch. Neerl. Sci. Exactes Nat.* 6, 118-126.

Diarra, A. y Sauve, R. (1992) Effects of thapsigargin and caffeine on Ca²⁺ homeostasis in HeLa cells: implications for histamine-induced Ca²⁺ oscillations. *Phlugers Arch.* 422, 40-47.

Diwan, J.J. (1987) Mitochondrial transport of K⁺ and Mg²⁺. *Biochim. Biophys. Acta.* 895, 155-165.

Dixon, J.F. y Hokin, L.E. (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.

Dixon, J.F. y Hokin, L.E. (1987) Inositol 1,2-cyclic 4,5-trisphosphate concentration relative to inositol 1,4,5-trisphosphate in pancreatic minilobules on stimulation with carbamylcholine in the absence of lithium. *J. Biol. Chem.* 262, 13892-13895.

Dockray, G. J. (1987). Physiology of enteric neuropeptides. En: "Physiology of the gastrointestinal tract" Ed. Johnson. Raven Press, New York. pp:41-66.

Dormer, R.L. y Williams, J. (1981) Secretagogue-induced changes in subcellular Ca²⁺ distribution in isolated pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 240, G130-G140.

Douglas, W. W. y Rubin, R. P. (1961) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol.*, 159: 40.

Doyle, C.M. y Jamieson, J.D. (1978) The development of secretagogue response in rat pancreatic acinar cells. *Dev. Biol.* 64, 11-27.

Ebashi, S. (1991) Excitation-contraction coupling and the mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 1-16.

Ederveen, A.G.H.; Ven Der Leest, J.V.M.; Van Emst-De Vries, S.E. y De Pont, J.J.H.H.M. (1989) Phosphorilation of low molecular mass cytosolic proteins by protein kinase C and protein kinase A in the rabbit exocrine pancreas. *Eur. J. Biochem.* 185, 461-468.

Ekholm, R.; Zelander, T. y Edlund, Y. (1962) The ultrastructural organization of the rat exocrine pancreas. IV. Centroacinar cells. *J. Ultrastruct. Res.* 7, 73-83.

Esteve, J.P.; Vaysse, N.; Susini, C.; Kunsch, J.M.; Fourmy, D.; Pradayrol, L.; Wunsch, E.; Moroder, L. y Ribet, A. (1983) Bimodal regulation of pancreatic exocrine function in vitro by somatostatin-28. *Am. J. Physiol.* 245, G208-G216.

Faltman, P.W. (1988) The control of red cell magnesium. *Manesium. Res.* 1, 5-11.

Fenn, W.O. y Cobb, D.M. (1934) The potassium equilibrium in muscle. *J. Gen. Physiol.* 17, 629-656.

Feray, J.G. y Garay, R. (1986) A Na⁺-stimulated Mg²⁺ transport system in human red blood cells. *Biochem. Biophysic. Acta.* 856, 76-84.

Ferrero, M.I.; Cano, M. y Ilundain, A.A. (1995) Na⁺-H⁺ exchange activity in brush-border membrane vesicles isolated from chick small intestine. *Biochim. Biophys. Acta.* 1235, 313-316.

Ferris, C.D.; Haganir, R.L.; Bredt, D.S. y Cameron, A.M. (1991) Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-

dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2232-2235.

Ferris, C.D.; Haganir, R.L.; Supattapone, S. y Snyder, S.H. (1989) Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature London* 342, 87-89.

Fineman, I.; Hart, D. y Nord, E.P. (1990) Intracellular pH regulates Na⁺-independent Cl⁻ base exchange in JTC-12 (proximal tubule) cells. *Am. J. Physiol.* 258, F883-F892.

Flatman, P.W. (1984) Magnesium transport across cell membrane. *J. Membr. Biol.* 80, 1-14.

Flatman, P.W. (1991) Mechanisms of magnesium transport. *Annu.Rev.Physiol.* 53, 259-271.

Flatman, P.W. (1993) The role of magnesium in regulating ion transport. En: "Magnesium and cell" Ed:N.J.Birch. Academic Press, London. pp. 197-216.

Flatman, P.W. y Smith, L.M. (1990) Magnesium transport in ferret red cells. *J. Physiol. Lond.* 431, 11-25.

Flatman, P. (1980) The effect of buffer composition and deoxygenation on the concentration of ionized magnesium inside human red blood cells. *J. Physiol. Lond.* 300, 19-30.

Folsch, U. R. y Creutzfeldt, W. (1976). Electrolyte secretion by a 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" Ed. Case y Goebell. MTP Press, Lancaster. pp:381-384.

Francis, L.P.; Lennard, R. y Singh, J. (1990) Mechanism of action of magnesium on acetylcholine-evoked secretory responses in isolated rat pancreas. *Exp. J. Biochem.* 80, 1-14.

Francis, L.P.; Camello, P.J.; Singh, J.; Salido, G.M. y Madrid, J.A. (1990) Effects of phorbol ester on cholecystokinin octapeptide-evoked exocrine pancreatic secretion in the rat. *J. Physiol. Lond.* 431, 27-37.

Francis, L.P.; Lennard, R. y Singh, J. (1990) Cellular mechanism of action of magnesium on acetylcholine-evoked secretory responses in the rat pancreas. *Exp. J. Biochem.* 75, 669-680.

Francis, L.P.; Singh, J. y Grundy, J. (1988) Acetylcholine-evoked protein secretion and Mg^{2+} and Ca^{2+} transport in isolated rat pancreatic segments. *Pflügers. Arch.* 411, R103.

Freedman, S.D. y Jamieson, J.D. (1982) Hormone-induced protein phosphorylation III. Regulation of the phosphorylation of the secretagogue-responsive 29000-dalton protein by both Ca^{2+} and cAMP in vitro. *J. Cell. Biol.* 95, 918-923.

Freedman, S.D. y Jamieson, J.D. (1982) Hormone-induced protein phosphorylation I. Relationship between secretagogue action and endogenous protein phosphorylation in intact cells from the exocrine pancreas and parotid. *J. Cell. Biol.* 95, 903-908.

Freedman, S.D. y Jamieson, J.D. (1982) Hormone-induced protein phosphorylation II. Localization to the ribosomal fraction from rat exocrine pancreas and parotid of a 29000-dalton protein phosphorylated in situ in response to secretagogues. *J. Cell. Biol.* 95, 909-917.

Frelin, C.; Vigne, P.; Ladoux, A. y Lazdunski, M. (1988) The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. *FEBS. Lett.* 174, 3-14.

Freundenrich, C.C.; Murphy, E.; Levy, L.A.; London, R.E. y Lieberman, M. (1992) Intracellular pH modulates cytosolic free magnesium in cultured chicken heart. *Am. J. Physiol.* 31, C1024-C1030.

Furuichi, T.; Yoshikawa, S.; Miyawaki, K.; Wada, K. y Mikoshiba, K. (1989) Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature London* 342: 32-38.

Ganser, A.L. y Forte, J.G. (1973) K⁺-stimulated ATPase in purified microsomes of bullfrog oocyte cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 307, 169-180.

Gao, B. y Gilman, A.G. (1991) Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10178-10182.

García Marin, L. J. (1989). Peptidos de tipo secretinico y función exocrina del páncreas en conejo anestesiado: influencia de la acidificación y de la alcalinización duodenal. Tesis Doctoral Ed. Universidad de Salamanca.

Gardner, J.D. y Jensen, R.T. (1981) Regulation of pancreatic enzyme secretion. En: "Physiology of the digestive tract" Ed: Johnson, L.R. Raven Press, New York. pp. 831-871.

Gardner, J. D.; Sutliff, V. E.; Walker, M. D. y Jensen, R. T. (1983) Effects of inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase on actions of cholecystokinin, bombesin and carbachol on pancreatic acini. *Am.J. Physiol.*, 245: G676-G680.

Gardner, J.D. y Jensen, R.T. (1986) Receptors and cell activation associated with pancreatic enzyme secretion. *Annu.Rev.Physiol.* 48, 103-117.

Gardner, J. D. y Jensen, R. T. (1987). Secretagogue receptors on pancreatic acinar cells. En: "Physiology of the gastrointestinal tract" Ed. Johnson. Raven Press, New York pp:1109-1127.

Gardner, J.D.; Korman, L.Y.; Walker, M.D. y Sutliff, V.E. (1982) Effects of inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase on the actions of vasoactive intestinal peptide and secretin on pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 242, G547-G551.

Gardner, J.D. y Rottman, A.J. (1979) Action of cholera toxin on dispersed acini from guinea pig pancreas. *Biochim. Biophys. Acta.* 585, 250-265.

Garner, M.M. y Burg, M.B. (1994) Macromolecular crowding and confinement in cells exposed to hypertonicity. *Am. J. Physiol.* 35 (Cell Physiol), C877-C892.

Gasslander, T.; Smeds, S.; Blomqvist, L. y Ihse, I. (1990) Proliferative response of different exocrine pancreatic cell types to hormonal stimuli. I. Effects of long-term cerulein administration. *Scand. J. Gastroent.*, 25: 1103-1110.

Gill, D.L.; Ghosh, T.K. y Mullaney, J.M. (1989) Calcium signalling mechanisms in endoplasmic reticulum activated by inositol 1,4,5-trisphosphate and GTP. *Cell. Calcium*. 10, 363-374.

Githens, S. (1988) The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation and culture. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7, 486-506.

Githens, S.; Schexnaider, J.A. y Frazier, M.L. (1992) Carbonic anhydrase II gene expression in mouse pancreatic duct cells. *Pancreas*. 7, 556-561.

Goldbetter, A.; Dupont, G. y Berridge, M.J. (1990) Minimal model for signal-induced Ca²⁺ oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1461-1465.

Gonzalez, A.; Pozo, M.J.; Camello, P.J.; Salido, G.M. y Pariente, J.A. (1993) Effects of phorbol esters and secretin on acetylcholine-evoked exocrine secretion in the anaesthetized rat. *Pharmacology Communications* 3 (3), 263-273.

Gorelick, F.S. y Jamieson, J.D. (1987) Structure-function relationship of the pancreas En: "Physiology of the gastrointestinal tract" Ed: Johnson, L.R. Raven Press, New York. pp. 1089-1108.

Gorelick, F.S. y Jamieson, J.D. (1994) The pancreatic acinar cell. Structure-function relationships En: "Physiology of the gastrointestinal tract" Ed: Johnson, L.R. Raven Press, New York. pp. 1353-1376.

Graber, M.L.; DiLillo, D.C.; Friedman, B.L. y Pastoriza-Munoz, E. (1986) Characteristics of fluoroprobes for measuring intracellular pH. *Analytical Biochemistry* 156, 202-212.

Grinstein, S.; Cohen, S.; Goetz, J.D. y Rothstein, A. (1985) Osmotic and phorbol ester-induced activation of Na^+/H^+ exchange: possible role of protein phosphorylation in lymphocyte volume regulation. *J. Cell. Biol.* 101, 269-276.

Grinstein, S.; Cohen, S.; Goetz, J.D.; Rothstein, A.; Mellors, A. y Gelfand, W. (1986) Activation of the Na^+/H^+ antiport by changes in cell volume and by phorbol ester; possible role of protein kinase. *Curr. Top. Membr. Transp.* 26, 115-136.

Grinstein, S.; Rutin, D. y Mason, M.J. (1989) Na^+/H^+ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim. Biophys. Acta.* 988, 73-97.

Grinstein, S.; Woodside, M.; Sardet, C.; Pouyssegur, J. y Rotin, D. (1992) Activations of the Na^+/H^+ antiporter during cell regulation. *J. Biol. Chem.* 267, 23823-23828.

Groblewski, G.; Wang, Y.; Kent, C. y Williams, J.A. (1992) Regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase in isolated rat pancreatic acinar cells. *Pancreas.* 7, 739.

Grynkiewicz, G.; Poenie, M. y Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.

Gunther, G.R. y Jamieson, J.D. (1979) Increased intracellular cyclic GMP does not correlate with protein discharge from pancreatic acinar cells. *Nature London* 280, 318-320.

Gunther, T. (1990) Functional compartmentation of intracellular magnesium. In: "Metal ions in biological systems. Compendium on magnesium and its role in biology, nutrition and physiology" Ed: Sigel, H. y Sigel, A. Marcel Dekker, New York. pp. 194-210.

Gunther, T.; Vormann, J. y Hollriegel, V. (1990) Characterization of Na^+ dependent Mg^{2+} efflux from Mg^{2+} -loaded rat erythrocytes. *Biochem. Biophysic. Acta.* 1023, 455-461.

Gupta, R.K.; Benovic, J.L. y Rose, Z.B. (1978) The determination of the free magnesium level in the human red blood cell by ^{31}P NMR. *J. Biol. Chem.* 253, 6172-6176.

Habara, Y. y Kanno, T. (1991) Dose-dependency in spatial dynamics of $[\text{Ca}]_c$ in pancreatic acinar cells. *Cell. Calcium.* 12, 533-542.

Haimovici, J.; Beck, J.S.; Molla-Hosseini, C.; Vallerand, D. y Haddad, P. (1994) Different modulation of hepatocellular Na^+/H^+ exchange activity by insulin and EGF. *Am. J. Physiol.* 267, G364-G370.

Halenda, S.P. y Rubin, R.P. (1982) Phospholipid turnover in isolated rat pancreatic acini. *Biochem. J.* 208, 713-721.

Han, J. K. y Nuccitelli, R. (1990) Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release in the organelle layers of the stratified, intact egg of *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.*, 110: 1103-1110.

Hampe, W.; Zimmermann, P. y Schulz, I. (1990) GTP-induced fusion of isolated pancreatic microsomal vesicles is increased by acidification of the vesicle lumen. *FEBS Lett.* 271, 62-66.

Hamosh, M.; Klaeveman, H.L.; Wolf, R.O. y Scow, R.O. (1975) Pharyngeal lipase and digestion of dietary triglyceride in man. *J. Clin. Invest.* 55, 908-913.

Hanssen, L. E. (1980) Pure synthetic bile salts release immunoreactive secretin in man. *Scand. J. Gastroent.*, 15: 461-463.

Hardman, J.G. y Sutherland, E.W. (1969) Guanyl cyclase an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3'-5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 244, 6363-6370.

Hausinger, D.; Lang, F. y Gerok, W. (1994) Regulation of cell function by the cellular hydration state. *Am. J. Physiol.* 30, E343-E355.

Heinonen, E. y Akerman, K.E.O. (1987) Intracellular free magnesium in synaptosomes measured with entrapped criochrome blue. *Biochim. Biophys. Acta.* 898, 331-337.

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

Hellmessen, W.; Christian, A.; Fasold, H. y Schulz, I. (1985) Coupled $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange in isolated acinar cells from rat exocrine pancreas. *Am. J. Physiol.* 249, G125-G136.

Henderson, L.J. (1908) Concerning the relationship between the strength of acids and their capacity to preserve neutrality. *Am. J. Physiol.* 21, 173-179.

Henrotte, J.G. (1993) Genetic regulation of cellular magnesium content. En: "Magnesium and Cell" Ed: Birch, N.J. Academic Press, London. pp. 177-216.

Hildebrand, P.; Beglinger, C. y Gyr, K. (1990) Effects of a cholecystokinin receptor antagonist on intestinal phase of pancreatic and biliary responses in man. *J. Clin. Invest.* 85, 640-646.

Hill, A.V. (1955) The influence of external medium on the internal pH of muscle. *Proc. R. Soc. B. London Ser.* 144, 1-22.

Hill, T.D.; Dean, N.M. y Boynton, A.L. (1988) Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate induces Ca^{2+} sequestration in rat liver cells. *Science* 242, 1176-1178.

Hokin, M.R. y Hokin, L.E. (1953) Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P into phospholipids of pancreas slices. *J. Biol. Chem.* 203, 967-977.

Hokin, M. R. y Hokin, L. E. (1954) Effects of acetylcholine on phospholipids in the pancreas. *J. Biol. Chem.*, 209: 549-558.

Hokin, L. E. y Hokin, M. R. (1955) Effects of acetylcholine on phosphate turnover in phospholipids of brain cortex in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, 16: 229-237.

Hokin, L. E. y Hokin, M. R. (1955) Effects of acetylcholine on the turnover of phosphoryl units in individual phospholipids of pancreas slices and brain cortex slices. *Biochim. Biophys. Acta*, 18: 102-110.

Hokin, L. E. y Hokin M R (1956) The actions of pancreozymin in pancreas slices and the role of phospholipids in enzyme secretion. *J. Physiol. Lond.*, 132: 442-453.

Hokin, M. R. y Hokin, L. E. (1959) The synthesis of phosphatidic acid from diglyceride and adenosine triphosphate in extracts of brain microsomes. *J. Biol. Chem.*, 234: 1381-1386.

Hokin, M. R. y Hokin, L. E. (1964). Interconversions of phosphatidylinositol and phosphatidic acid involved in the response to acetylcholine in the salt gland. En: "Metabolism and physiological significance of lipids" Ed. Dawson y Rhodes. John Wiley, New York. pp:423-434.

Hokin, L. E. (1966) Effects of calcium omission on acetylcholine-stimulated amylase secretion and phospholipid synthesis in pigeon pancreas slices. *Biochim. Biophys. Acta*, 115: 219-221.

Hokin, L.E. (1985) Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 205-235.

Hokin, L. E.; Dixon, J. F.; Reichman, M. y Sekar, M. C. (1987). Biochemical aspects of the phosphoinositide signalling system with special emphasis on the inositol cyclic phosphates and arachidonate. En: "Mechanisms of signal transduction by hormones and growth factors" Ed. Alan R. Liss pp:149-158.

Hokin, L. E. y Dixon, J. F. (1990). Evidence for direct phosphodiesteratic cleavage of phosphatidylinositol in pancreatic minilobules stimulated with carbachol. En: "The biology and medicine of signal transduction" Ed. Nishizuka. Raven Press, New York pp:140-146.

Holian, O.; Bombeck, C. T. y Nyhus, L. M. (1980) Hormonal stimulation of cAMP-dependent protein kinase in rat pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95: 553-561.

Holst, J. J. (1986). Neural regulation of pancreatic exocrine function. En: "The exocrine pancreas: biology, pathobiology, and diseases" Ed. Go, Gardner, Brooks, Lebenthal, DiMugno y Scheele. Raven Press, New York pp:287-300.

Hootman, S.R. y Williams, J.A. (1987) Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus En:"Physiology of the gastrointestinal tract" Ed:Johnson, L.R.; Christensen, J.M.; Jackson, M.; Jakobson, E.D. y Walsh, J.H. Raven Press, New York. pp. 1129-1146.

Houslay, M.D. (1992) G-protein linked receptors: a family probed by molecular cloning and mutagenesis procedures. Clin. Endocrinol. 36, 525-534.

Hue, L. (1994) Control of liver carbohydrate and fatty acid metabolism by the cell volume. Biochem. Soc. Trans. 22, 505-508.

Hurley, T. W. y Brinck, R. W. (1990) Regulating transient and sustained changes of cytosolic Ca^{2+} in rat pancreatic acini. Am. J. Physiol., 258: C54-C61.

Hurley, T.W.; Ryan, M.P. y Brinck, R.W. (1992) Changes of cytosolic Ca^{2+} interfere with measurements of cytosolic Mg^{2+} using mag-fura-2. Am. J. Physiol. 263, C300-C307.

Hutter, O.F. y Warner, A.E. (1967a) The pH sensitivity of the choline conductance of frog skeletal muscle. J. Physiol. Lond. 189, 403-425.

Hutter, O.F. y Warner, A.E. (1967b) The effect of pH on the ^{36}C efflux from frog skeletal muscle. J. Physiol. Lond. 189, 427-443.

Illner, H.I.; McGuigan, J.A.S. y Luthi, D. (1992) Evaluation of mag-fura-5, the new fluorescent indicator for free magnesium measurements. Pflugers. Arch. 422, 179-184.

Ilundain, A. (1992) Intracellular pH regulation in intestinal and renal epithelial cells. Comp. Biochem. Physiol. A. 101 A, 413-424.

Irvine, R.F. (1992) Inositol phosphates and Ca^{2+} entry: toward a proliferation or a simplification? *FASEB J.* 6, 3085-3091.

Irvine, R.F.; Letcher, A.J.; Heslop, J.P. y Berridge, M.J. (1986) The inositol tris/tetrakisphosphate pathway demonstration of $\text{Ins}(1,4,5)\text{IP}_3$ 3-kinase activity in animal tissues. *Nature London* 320, 631-634.

Irvine, R.F. y Moor, R.M. (1986) Micro-injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca^{2+} . *Biochem. J.* 250, 917-920.

Ives, H.E. y Daniel, T.O. (1987) Interrelationship between growth factor-induced pH changes and intracellular Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 1950-1954.

Iwashita, S. y Kobayashi, M. (1992) Signal transduction system for growth factor receptors associated with tyrosine kinase activity: EGF receptro signalling and its regulation. *Cellular Signalling* 4: 123-132.

Iwatsuki, K.; Ikeda, K. y Chiba, S. (1981) Effects of histamine on pancreatic exocrine secretion in the dog. *Archs. Int. Pharmacodyn. Ther.* 251, 166-176.

Jackson, P.S. y Strange, K. (1993) Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am. J. Physiol.* 265 (34), G1489-G1500.

Jaken, S. (1989). Diacilglicerol: the role of stimulated production in activation of PK-C. En: "Inositol lipids in cell signalling" Ed. Academic Press pp:163-178.

Jagendorf, A.T. y Uribe, E. (1966) ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. *Biochemistry.* 55, 170-177.

Jahn, R. y Soling, H.D. (1983) Phosphorilation of the ribosomal protein S6 in response to secretagogues in gi=uinea pig exocrine pancreas, parotid and lacrimal gland. *FEBS. Lett.* 153, 71-80.

Jensen, R.T. y Gardner, J.D. (1978) Cyclic nucleotide-dependent protein kinase activity in acinar cells from guinea pig pancreas. *Gastroenterology.* 75, 806-817.

Jensen, R.T. y Gardner, J.D. (1981) Identification and characterization of receptors for secretagogues on pancreatic acinar cells. *Fed. Procs.* 40, 2486-2496.

Jensen, R.T.; Lemp, G.F. y Gardner, J.D. (1980) Interaction of cholecystinin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77 (4), 2079-2083.

Jensen, R.T.; Tatemoto, K.; Mutt, V.; Lemp, G.F. y Gardner, J.D. (1981) Actions of a newly isolated intestinal peptide PHI on pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 241, G498-G502.

Jentsch, T.J.; Janicke, I.; Sorgenfrei, D.; Keller, S.K. y Wiederholt, M. (1986) The regulation of intracellular pH in monkey kidney epithelial cells (BSC-1). Roles of Na^+/H^+ antiport, $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ (Na_2CO_3) symport and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange. *J. Biol. Chem.* 261: 12120-12127.

Jentsch, T.J.; Schill, B.S.; Schwartz, H.; Keller, S.K. y Wiederholt, M. (1985) Kidney epithelial cell of monkey origin (BSC-1) express a sodium bicarbonate cotransport. *J. Biol. Chem.* 260: 15554-15560.

Johnson, J.J.; Epel, D. y Paul, M. (1976) Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. *Nature London* 262, 661-664.

Jorpes, J.E. y Mutt, V. (1962) The gastrointestinal hormones secretin and cholecystinin. En: "The exocrine pancreas" Ed: Reuck, A.V.S. y Cameron, M.P. Ciba Found. Symp., Churchill, London. pp. 150-164.

Joseph, S.K. y Williamson, J.R. (1986) Characteristics of inositol triphosphate-mediated Ca^{2+} release from permeabilized hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 261, 14658-14664.

Juma, L.M.O.; Wisdom, D.M. y Singh, J. (1995) Magnesium homeostasis in the exocrine rat pancreas: effects of electrical field stimulation and acetylcholine. *Proc. Int. Magnesium Congress*, (in press).

Kanno, T. y Saito, A. (1976) The potentiating influences of insulin on pancreozymin-induced hyperpolarization and amylase release in the pancreatic acinar cell. *J. Physiol. Lond.* 261, 505-521.

Kapoor, C.L. y Krishna, G. (1978) A possible role for guanosine 3',5'-monophosphate in stimulus secretion coupling in exocrine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta.* 544, 102-112.

Kapus, A.; Grinstein, S.; Wasan, S.; Kandasamy, R. y Orlowski, J. (1994) Functional characterization of three isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 269, 23544-23552.

Kasai, H. y Augustine, G.J. (1990) Cytosolic Ca²⁺ gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. *Nature London* 348, 735-738.

Kato, Y. y Kanno, T. (1983) Thyrotropin-releasing hormone injected intracerebroventricularly in the rat stimulates exocrine pancreatic secretion via the vagus nerve. *Regul. Pept.* 7, 343-356.

Kaziro, Y. (1990). Molecular biology of G-protein. En: "G-proteins as mediators of cellular signalling processes. Molecular pharmacology of cell regulation. Vol. 1." Ed. Houslay y Milligan. John Wiley & Sons, Chichester. pp:47-66.

Kempen, H. J. M.; De Pont, J. J. H. H. M. y Bonting, S. L. (1975) Rat pancreas adenylate cyclase. III. Its role in pancreatic secretion assessed by means of cholera toxin. *Biochim. Biophys. Acta*, 392: 276-287.

Kern, H.F. (1986) Fine structure of the human exocrine pancreas En: "The exocrine pancreas: biology, pathobiology and diseases" Ed: Go, V.L.W.; Garder, J.D.; Brooks, F.P.; Lebenthal, E.; Dimagno, E.P. y Scheele, G.A. Raven Press, New York. pp. 9-19.

King, G.G.; Lohrmann, W.E.; Ickes, J.W. y Feldman, G.M. (1994) Identification of Na⁺/H⁺ exchange on the apical side of surface colonocytes using BCECF. *Am. J. Physiol.* 267, G119-G128.

Kinsella, J.L. y Aronson, P.S. (1980) Properties of the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 238 (Renal Fluid Electrolyte Secretion 7.), F461-F469.

Kite, G.L. (1913) Studies on the physical properties of the protoplasm I. The physical properties of the protoplasm of certain animal and plant cells. *Am. J. Physiol.* 32, 146-164.

Klueppelberg, U.G.; Gates, L.K.; Gorelick, F.S. y Miller, L.J. (1991) Agonist-regulated phosphorylation of the pancreatic cholecystokinin receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 2403-2408.

Komabayashi, T.; McKinney, J. S. y Rubin R P (1990) Regulation by diacylglycerol of calcium-evoked amylase secretion from intact and permeabilized pancreatic acinar cells. *Cell Calcium*, 11: 501-506.

Konishi, Y.; Kaku, K.; Inoue, Y. y Kaneko, T. (1990) An in vitro evaluation of adrenergic action on rat pancreatic amylase secretion: lack of stimulatory effect. *Endocrinol. Japan.*, 37: 511-519.

Konturek, S.J.; Dembinski, A.; Krol, R. y Wunsch, E. (1976) Effects of motilin on gastric and pancreatic secretion in dogs. *Scan. J. Gastroenterol.* 11, 57-61.

Kopito, R.R. (1990) Molecular biology of the anion exchanger gene family. *Int. Rev. Cytol.* 123, 177-199.

Kopito, R.R.; Lee, B.S.; Simmons, D.M.; Lindsey, A.E.; Morgans, C.W. y Schneider, K. (1989) Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell.* 59, 927-937.

Kopito, R.R. y Lodish, H.F. (1985) Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. *Nature London* 316, 234-238.

Korman, L.Y.; Walker, M.D. y Gardner, J.D. (1980) Action of theophylline on secretagogue-stimulated amylase release from dispersed pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 239, G324-G333.

Krebs, E.G. y Beavo, J.A. (1979) Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 923-959.

Krims, P. E. y Pandol, S. J. (1988) Free cytosolic calcium and secretagogue-stimulated initial pancreatic exocrine secretion. *Pancreas*, 3: 383-390.

Krnjevic, K. y Lisiewicz, A. (1972) Injections of calcium ions into spinal motor neurons. *J. Physiol. Lond.* 255, 363-390.

Kuijpers, G.A.J.; Van Nooy, I.G.P.; De Pont, J.J.H.H.M. y Bonting, S.L. (1984) Anion secretion by the isolated rabbit pancreas. *Biochim. Biophys. Acta.* 774, 269-276.

Kuno, M. y Gardner, P. (1987) Ion channels activated by inositol 1,4,5-trisphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. *Nature London* 326, 301-304.

Kuvshinoff, B.W.; Brodish, R.M.; James, L.; McFadden, D.W. y Fink, A.S. (1993) Somatostatin inhibits secretin induced canine pancreatic response via a cholinergic mechanism. *Gastroenterology.* 105, 539-547.

Lajas, A.I.; Pariente, J.A. y Salido, G.M. (1995) Histamine and the cAMP pathway in the guinea-pig pancreas. *Cell. Signal.* 27, 57-60.

Lajas, A.I.; Pozo, M.J.; Salido, G.M.; Singh, J. y Pariente, J.A. (1996) Secretory activity and trophic effects of epidermal growth factor in the rat pancreas. *Archives of Physiology and Biochemistry* 104, .

L'Allemain, G.; Franchi, A.; Cragoe, E. Jr. y Pouységur, J. (1984) Blockade of the Na⁺/H⁺ antiport abolishes growth factor-induced DNA synthesis in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259: 4313-4319.

L'Allemain, G.; Paris, S. y Pouységur, J. (1985) Role of a Na⁺-dependent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in regulation of intracellular pH in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 260: 4877-4883.

Lambert, M. y Christophe, J. (1978) Characterization of (Mg²⁺:Ca²⁺)-ATPase activity in rat pancreatic plasma membranes. *Exp. J. Biochem.* 91, 485-492.

Lang, F.; Busch, G.L.; Volkl, H. y Haussinger, D. (1995) Cell volume: a second message in regulation of cellular function. *NIPS 10* (Febrero 1995), 18-22.

Lang, F. y Hausinger, D. (1993): *Interaction of Cell Volume and Cell Function. Advances in Comparative and Environmental Physiology. Vol. 14.* Springer-Verlag, Heidelberg-Germany.

Larose, L.; Dumont, Y.; Asselin, J.; Morisset, J. y Poirier, G. G. (1981) Muscarinic receptor of rat pancreatic acini: [³H]QNB binding and amylase secretion. *Eur. J. Pharmacol.*, 76: 247-254.

Lax, D.; Martinez-Zaguilan, R. y Gillies, R.J. (1994) Furazolidone increases thapsigargin-sensitive Ca²⁺-ATPase in chick cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 36, H734-H741.

Layer, P.; Chan, A.T.H.; Go, V.L.W.; Zinsmeister, A.R. y DiMagno, E.P. (1993) Cholinergic regulation of phase II interdigestive pancreatic secretion in humans. *Pancreas.* 8, 181-188.

Lechleiter, J.D. y Clapham, D.E. (1992) Spiral waves and intracellular calcium signalling. *J. Physiol. Lond.* 86, 123-128.

Lee, P. C.; Leung, Y. K.; 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.

Lennard, R. (1991) Effects of diltiezen, verapamil and gallopamil on acetylcholine-evoked Mg²⁺ and Ca²⁺ mobilization in rat exocrine pancreas. *Med. Sci. Res.* 19, 707-709.

Lennard, R.; Francis, L.P. y Singh, J. (1989) Extracellular magnesium regulates acetylcholine-evoked amylase secretion and calcium mobilisation in rat pancreatic acinar cells. *Quatr. J. Expt. Physiol.* 74, 747-750.

Lennard, R. y Singh, J. (1990) Measurement of intracellular free magnesium concentration in pancreatic acinar cells using magfura. *J. Physiol. Lond.* 429, 91P.

Lennard, R. y Singh, J. (1991) Secretagogue-evoked changes in intracellular free magnesium concentrations in rat pancreatic acinar cells. *J. Physiol. Lond.* 435, 483-492.

Lennard, R. y Singh, J. (1992) Effects of secretagogues on intracellular free calcium and magnesium concentrations in rat pancreatic acinar cells. *Gen. Pharmacol.* 23, 903-908.

Lenz, H.J.; Messmer, B. y Zimmerman, F.G. (1992) Noradrenergic inhibition of canine gallbladder contraction and murine pancreatic secretion during stress by corticotropin-releasing factor. *J. Clin. Invest.* 89, 437-443.

Levine, S.A.; Montrose, M.H.; Tse, C.M. y Donowitz, M. (1993) Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na⁺/H⁺ exchangers stably expressed in fibroblast cell line. *J. Biol. Chem.* 268, 25527-25535.

Levy, L.A.; Murphy, E.; Raju, B. y London, R.E. (1988) Measurement of cytosolic free magnesium ion concentration by ¹⁹F NMR. *Biochemistry.* 27, 4041-4048.

Lieberman, D.M. y Reithmeier, R.A.F. (1988) Localization of the carboxyl terminus of band 3 to the cytoplasmic side of the erythrocyte membrane using antibodies raised against a syntetic peptide. *J. Biol. Chem.* 263, 10022-10028.

Lignon, M. F.; Galas, M. C.; Rodriguez, M. y Martinez, J. (1990) Correlation between phospholipid breakdown, intracellular calcium mobilization and enzyme secretion in rat pancreatic acini treated with Boc-[Nle21,Nle31]-CCK-7 and JMV-180, two cholecystokinin analogues. *Cellular Signalling*, 2: 339-346.

Loeffholz, K. (1989) Receptor regulation of choline phospholipid hydrolysis. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1543-1549.

Logsdon, C.D. y Williams, J.A. (1983) Epidermal growth factor binding and biologic affects on mouse pancreatic acini. *Gastroenterology.* 85, 339-345.

Lohr, J.W. y Grantham, J.J. (1986) Isovolumetric regulation of isolated S2 proximal tubules in anisotonic media. *J. Clin. Invest.* 78, 1165-1172.

Long, B.W. y Gardner, J.D. (1977) Effects of cholecystokinin on adenylate cyclase activity in dispersed pancreatic acinar cells. *Gastroenterology.* 73, 1008-1014.

Lorentzon, P.; Eklundh, B.; Brandstorm, A. y Walmark, B. (1985) The mechanism for inhibition of gastric (H⁺/K⁺)-ATPase by omeprazole. *Biochim. Biophys. Acta.* 817, 25-32.

Lorenz, W.; Haubensak, G.; Hutzel, M. y Werle, E. (1968) Histamine release in submandibulary gland and pancreas by parasympathicomimetic drugs, peptide hormones, histamine and mepyramine. *Naunym-Schmiedebergs Arch Pharma. u exp. Path* 260, 416-437.

Lorenz, W.; Matejka, E.; Schmal, A.; Seidel, W.; Reimann, H.J.; Uhlig, R. y Mann, G.A. (1973) A phylogenetic study on the occurrence and distribution of histamine in the gastrointestinal tract and other tissues of the man and various animals. *Comp Gen Pharmac* 4, 229-250.

Lorenz, W.; Schauer, A.; Heitland, S.; Calvoer, R. y Werle, E. (1969) Biochemical and histochemical studies on the distribution of histamine in the digestive tract of man, dog and other mammals. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmac* 265, 81-100.

Louie, D. S. y Owyang, C. (1986) Muscarinic receptor subtypes on rat pancreatic acini: secretion and binding studies. *Am. J. Physiol.*, 251: G275-G279.

Louie, D.S.; Chen, H.T. y Owyang, C. (1988) Inhibition of exocrine pancreatic secretion by opiates is mediated by suppression of cholinergic transmission: characterization of receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246, 132-136.

Luiken, J.J.F.P.; Blommaart, E.F.C.; Boon, L.; Van Woerkom, G.M. y Meijer, A. (1994) Cell swelling and the control of autophagic proteolysis in hepatocytes: involvement of phosphorylation of ribosomal protein S6. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 508-511.

Margolis, B.; Rhee, S.G.; Felder, S.; Mervic, M.; Lyall, R.; Levitzki, A.; Ullrich, A.; Zilberstein, A. y Schlessinger, J. (1989) EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell* 57: 1101-1107.

Marshall, P.J.; Dixon, J.F. y Hokin, L.E. (1982) Prostaglandin E2 derived from phosphatidylinositol breakdown in the exocrine pancreas facilitates secretion by an action on the ducts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221, 645-649.

Martin, T. F. J. (1989). Lipid hydrolysis by phosphoinositidase C: enzymology and regulation by receptors and guanine nucleotides. En: "Inositol lipids in cell signalling" Ed. Academic Press pp:81-112.

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

Maruyama, Y.; Inooka, G.; Li, Y.X.; Miyashita, Y. y Kasai, H. (1993) Agonist-induced localized Ca^{2+} spikes directly triggering exocytotic secretion in exocrine pancreas. *Embo. J.* 12, 3017-3022.

Matozaki, T.; Goke, B.; Tsunoda, Y.; Rodriguez, M.; Martinez, J. y Williams, J.A. (1990) Two functionally distinct cholecystokinin receptors show different modes of action on Ca^{2+} mobilization and phospholipid hydrolysis in isolated rat pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* 265, 6247-6254.

Matozaki, T.; Sakamoto, C.; Nago, M.; Nishizuki, H. y Baba, S. (1988) G-protein stimulation of PI hydrolysis by CCK in isolated rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.* 255, E652-E659.

Matozaqui, T. y Williams, J.A. (1989) Multiple sources of 1,2-diacylglycerol in isolated rat pancreatic acini stimulated by cholecystokinin. *J. Biol. Chem.* 264, 14729-14734.

Matozaki, T.; Goke, B.; Tsunoda, Y.; Rodriguez, M.; Martinez, J. y Williams, J. A. (1990) Two functionally distinct cholecystokinin receptors show different modes of

action on Ca^{2+} mobilization and phospholipids hydrolysis in isolated rat pancreatic acini. *J. Biol. Chem.*, 265: 6247-6254.

Matozaki, T.; Zhu, W.-Y.; Tsunoda, Y.; Goke, B. y Williams, J.A. (1991) Intracellular mediators of bombesin action on rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.* 260, G858-G864.

Meech, R.W. (1972) Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. *Comp. Biochem. Biophys.* 42A, 493-499.

Meech, R.W. y Thomas, R.C. (1977) The effect of calcium injection on the intracellular sodium and pH of snail neurones. *J. Physiol. Lond.* 265, 867-879.

Meech, R.W. y Thomas, R.C. (1980) Effect of measured calcium chloride injections on the membranes potential and internal pH of snail neurones. *J. Physiol. Lond.* 298, 111-129.

Meissner, G.; Darling, E. y Eveleth, J. (1986) Kinetics of rapid Ca^{2+} release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} and adenine nucleotides. *Biochemistry.* 25, 236-244.

Meldrum, E.; Parker, P.J. y Carozzi, A. (1991) The PtdIns-PLc superfamily and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1092, 49-71.

Mellman, I.; Fuchs, R. y Helenius, A. (1986) Acidification of the endocytotic and exocytotic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 663-700.

Menozi, D.; Sato, S.; Jensen, R.T. y Gardner, J.D. (1989) Cyclic GMP does not inhibit protein kinase C-mediated enzyme secretion in rat pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* 264, 995-999.

Menozi, D.; Vinayek, R.; Jensen, R. T. y Gardner, J. D. (1991) Down-regulation and recycling of high affinity cholecystokinin receptors on pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.*, 266: 10385-10391.

Merritt, J.E. y Rink, T.J. (1987) Regulation of cytosolic free calcium in fura-2 loaded rat parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.* 262: 17362-17369.

Merritt, J.E.; Taylor, C.W.; Rubin, R.P. y Putney, J.W.J. (1986) Isomers of inositol trisphosphate in exocrine pancreas. *Biochem. J.* 238, 825-829.

Messmer, B.; Zimmerman, F.G. y Lenz, H.J. (1993) Regulation of exocrine pancreatic secretion by cerebral TRH and CGRP: role of VIP, muscarinic and adrenergic pathways. *Am. J. Physiol.* 264, G237-G242.

Metchnikoff, E. (1893) *Lectures in Comparative Pathology of Inflammation*. Paul, Kegan, Trench, Trubner and Co, London.

Meyer, J.H. (1981) Control of pancreatic exocrine secretion En: "Physiology of the gastrointestinal tract" Ed: Johnson, L.R. Raven Press, New York. pp. 821-829.

Meyer, T. y Stryer, L. (1988) Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5051-5055.

Michaelis, L. (1922): *Die Wasserstoffionenkonzentration*. Berlin: Springer.

Michaelis, L. y Davidoff, W. (1912) Methodisches und Sachliches zur elektrometrischen. Bestimmung der Blut-Alkalescenz. *Biochem. Z.* 46, 131-150.

Michaelis, L. y Kramsztyk, A. (1914) Die Wasserstoffionenkonzentration der Gewebssafte. *Biochem. Z.* 62, 180-185.

Milutinovic, S.; Schulz, I.; Rosselin, G. y Fasold, H. (1977). The interaction of pancreatic secretagogues with pancreatic plasma membranes. Symposium on hormonal receptors in digestive tract physiology Ed. Royaumont, France, Sept. pp:22-24.

Mitchel, R.H. (1975) Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta.* 415, 81-147.

Mitchell, P. (1976) Vectorial chemistry and the molecular mechanisms of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity. *Biochem. Proc. trans.* 4, 399-430.

Moon, R.B. y Richards, J.H. (1973) Determination of intracellular pH by ^{31}P magnetic resonance. *J. Biol. Chem.* 248, 7276-7278.

Morris, A.P.; Gallacher, D.V.; Irvine, R.F. y Petersen, O.H. (1987) Synergism of inositol trisphosphate and tetrakisphosphate in activating Ca^{2+} -dependent K^{+} channels. *Nature London* 330, 653-655.

Mossner, J.; Logsdon, C.D.; Williams, J.A. y Goldfine, J.D. Insulin, via its own receptor, regulates growth and amylase synthesis in pancreatic acinar AR42J cells. *Diabetes* (1985) 34: 891-897.

Motais, R.; Guizouarn, H. y Garcia-Romeu, F. (1991) Red cell volume regulation: the pivotal role of ionic strength in controlling swelling-dependent transport systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1075, 169-180.

Muallem, S.; Schoeffield, M. S.; Pandol, S. J. y Sachs, G. (1985) Inositol trisphosphate modification of ion transport in rough endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4433-4437.

Muallem, S.; Beeker, T. y Pandol, S. J. (1988) Role of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange and the plasma membrane Ca^{2+} pump in hormone-mediated Ca^{2+} efflux from pancreatic acini. *J. Membrane Biol.*, 102: 153-162.

Muallem, S.; Fimmel, C.J.; Pandol, S.J. y Sachs, G. (1986) Regulation of free cytosolic Ca^{2+} and secretion in parietal and peptic cells. *J. Biol. Chem.* 261: 2660-2667.

Muallem, S.; Schoeffield, M. S.; Fimmel, C. J. y Pandol, S. J. (1988) Agonist-sensitive calcium pool in the pancreatic acinar cell. I. Permeability properties. *Am. J. Physiol.*, 255: G221-G228.

Muallem, S.; Schoeffield, M. S.; Fimmel, C. J. y Pandol, S. J. (1988) Agonist-sensitive calcium pool in the pancreatic acinar cell. II. Characterization of reloading. *Am. J. Physiol.*, 255: G229-G235.

Muallem, S.; Pandol, S. J. y Beeker, T. G. (1988) Two components of hormone-evoked calcium release from intracellular stores of pancreatic acinar cells. *Biochem. J.*, 255: 301-307.

Muallem, S. (1989) Calcium transport pathways of pancreatic acinar cells. *Annu.Rev.Physiol.* 51, 83-105.

Muallem, S.; Khademazad, M. y Sachs, G. (1990) The route of Ca^{2+} entry during reloading of the intracellular Ca^{2+} pool in pancreatic acini. *J. Biol. Chem.*, 265: 2011-2016.

Muallem, S. y Loesssberg, P.A. (1990a) Intracellular pH-regulatory mechanisms in pancreatic acinar cells I. Characterization of H^+ and HCO_3^- transporters. *J. Biol. Chem.* 265 (22), 12806-12812.

Muallem, S. y Loessberg, P.A. (1990b) Intracellular pH-regulatory mechanisms in pancreatic acini. II. Regulation of H^+ and HCO_3^- transporters by Ca^{2+} -mobilizing agonists. *J. Biol. Chem.* 265, 12813-12819.

Muallem, S.; Pandol, S.J. y Beeker, T.G. (1989a) Modulation of agonist-stimulated calcium influx by extracellular pH in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 257, G917-G924.

Muallem, S.; Pandol, S.J. y Beeker, T.G. (1989b) Hormone-evoked calcium release from intracellular stores is a quantal process. *J. Biol. Chem.* 264: 205-212.

Mullins, L.J.; Brinley, F.J.J.; Spangler, S.G. y Abercrombie, R.F. (1978) Magnesium efflux in dialyzed squid axons. *J. Gen. Physiol.* 69, 389-400.

Murer, H.; Hopfer, U. y Kinne, R. (1976) Sodium, proton antiport in brush border membranes isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem. J.* 154, 597-602.

Murillo, L.J.; Torres-Cisneros, J.; Blanco-Molina, J.; Lopez-Molina, J. y De la Puebla, R.A.F. (1992) "In vitro" action of histamine and cimetidine on amylase secretion in the rat pancreas. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 13, 369-374.

Nahorski, S. R. y Potter, B. V. L. (1989) Molecular recognition of inositol polyphosphates by intracellular receptors and metabolic enzymes. *TIPS*, 10: 139-144.

Nairn, A. C.; Bhagat, B. y Palfrey, H. C. (1985) Identification of calmodulin-dependent protein kinase III and its major Mr 100,000 substrate in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 7939-7943.

Nairn, A.C. y Palfrey, H.C. (1987) Identification of the major Mr 100000 substrate for calmodulin dependent protein kinase III in mamalian cells as elongation factor-2. *J. Biol. Chem.* 262, 17299-17303.

Nathanson, M.H.; Padfield, P.J.; O'Sullivan, A.J.; Burgstahler, A.D. y Jamieson, J.D. (1992) Mechanism of Ca^{2+} wave propagation in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 267, 18118-18121.

Nauntofte, B. (1992) Regulation of electrolite and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am. J. Physiol.* 263 (Gastrointest. Liver Physiol. 26), G823-G837.

Needham, J. y Needham, D. (1925) The hydrogenion concentration and the oxidation-reduction potential of the cell-interior: a micro-injection study. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 98, 259-286.

Neilsen, S.P. y Petersen, O.H. (1972) Transport of calcium in the perfused submandibular gland of the cat. *J. Physiol. Lond.* 223, 685-697.

Nicotera, P.; Orrenius, S.; Nilsson, T. y Berggren, P. O. (1990) An inositol 1'4'5'-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool in liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6858-6862.

Niedel, J. E. y Blackshear, P. J. (1986). Protein kinase C. En: "Receptor biochemistry and methodology. Vol. 7. Phosphoinositides and receptor mechanisms" Ed. Putnay, J.. Alan R. Liss, New York. pp:47-88.

Nigam, S.K. y Blobel, G. (1989) Cyclic AMP-dependent protein kinase in canine pancreatic rough endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264, 16927-16932.

Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature London* 308, 693-697.

Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334: 661-665.

Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.

O'Donohue, T. L.; Charlton, C. G.; Miller, R. L.; Boden, G. y Jacobowitz, D. M. (1981) Identification, characterization and distribution of secretin immunoreactivity in rat and pig brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 5221.

Ohkuma, S. y Poole, B. (1978) Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 3327-3331.

Olsnes, S.; Tonnessen, T.I. y Sandvig, K. (1986) pH-regulated anion antiport in nucleated mammalian cells. *J. Cell. Biol.* 102, 967-971.

Orci, L.; Ravazzola, M. y Anderson, R. (1987) The condensing vacuole of exocrine cells is more acidic than the mature secretory vesicle. *Nature London* 326, 77-79.

Orlowski, J. (1993) Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE1) and low affinity (NHE3) isoforms of the rat Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 268, 16369-16377.

Osipchuk, Y.V.; Wakui, M.; Yule, D.I.; Gallacher, D.V. y Petersen, O.H. (1990) Cytoplasmic Ca²⁺ oscillations evoked by receptor stimulation, G-protein activation, internal application of inositol triphosphate or Ca²⁺: simultaneous microfluorimetry and Ca²⁺-dependent Cl⁻ current recording in single pancreatic acinar cells. *Embo. J.* 9, 697-704.

Overton, F. (1902) Beiträge zur allgemeinen Muskel und Nervenphysiologie. *Pflügers Arch.* 92: 115-280.

Pan, G.Z.; Collen, M.J. y Gardner, J.D. (1982) Action of cholera toxin on dispersed acini from rat pancreas. Post-receptor stimulation involving cyclic AMP and calcium. *Biochim. Biophys. Acta.* 720, 338-345.

Pandol, S.J. (1984) Growth hormone-releasing factor stimulates pancreatic enzyme secretion. *Science* 225, 326-328.

Pandol, S.J.; Gukovskaya, A.; Bahnson, T.D. y Dionne, V.E. (1994) Cellular mechanisms mediating agonist-stimulated calcium influx in the pancreatic acinar cell. *Annals of the New York Academy of Sciences* 713: 41-48.

Pandol, S.J.; Hsu, Y.; Kondratenko, N.F.; Schoeffield-Payne, M.S. y Steinback, J.S. (1991) Dual pathways for agonist-stimulated arachidonic acid release in pancreatic acini: roles in secretion. *Am. J. Physiol.* 260, G423-G433.

Pandol, S.J. y Schoeffield, M.S. (1986) 1,2-Diacylglycerol, protein kinase C and pancreatic enzyme secretion. *J. Biol. Chem.* 10, 4438-4444.

Pandol, S.J. y Schoeffield, M.S. (1987) The agonist-sensitive calcium pool in the pancreatic acinar cell. *J. Biol. Chem.* 262, 16963-16968.

Pandol, S.J. y Schoeffield-Payne, M.S. (1990) Cyclic GMP mediates the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cell. *J. Biol. Chem.* 265, 12846-12853.

Pandol, S.J., Schoeffield, M.S.; Fimmel, C.J. y Muallem, S. (1987) The agonist-sensitive calcium pool in the pancreatic acinar cell. *J. Biol. Chem.* 35: 16963-16968.

Pandol, S.J.; Schoeffield, M.S.; Sachs, G. y Muallem, S. (1985) The role of free cytosolic calcium in secretagogues stimulated amylase release from dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 260: 10081-10086.

Pariente, J.A.; Madrid, J.A. y Salido, G.M. (1989) Histamine receptors in unstimulated pancreatic exocrine secretion of the rabbit. *Agents Actions* 28, 62-69.

Pariente, J.A.; Francis, L.P.; Salido, G.M. y Madrid, J.A. (1990) Cimetidine increases the pancreatic response to histamine. *Agents Actions* 30, 307-312.

Pariente, J. A.; Madrid, J. A. y Salido, G. M. (1990) Role of histamine receptor in rabbit pancreatic exocrine secretion stimulated by cholecystokinin and secretin. *Exp. Physiol.*, 1990: 657-667.

Pariente, J.A.; Singh, J.; Salido, G.M.; Jennings, L. y Davison, J.S. (1991) Activation of histamine receptors is associated with amylase secretion and calcium mobilisation in guinea pig acinar cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 1, 111-120.

Parker, I. y Ivorra, I. (1991) Inositol tetrakisphosphate liberates stored Ca^{2+} in *Xenopus* oocytes and facilitates responses to inositol trisphosphate. *J. Physiol.*, 433: 207-227.

Parker, P.J.; Kour, G.; Marais, R.M.; Mitchell, F.; Pears, P.; Scaap, D.; Stabel, S. y Webster, C. (1989) Protein kinase C-a family affair. *Mol. Cell. Endocrinol.* 65, 1-11.

Pearson, G. T.; Singh, J. y Petersen, O. H. (1984) Adrenergic nervous control of cyclic-AMP-mediated amylase secretion in the rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 246: G563-G573.

Pearson, G.T.; Flanagan, P.M. y Petersen, O.H. (1984) Neuronal and hormonal control of membrane conductance in the pig pancreatic acinar cells. *J. Physiol. Lond.* 247, 520-526.

Pearson, G.T.; Singh, J.; Daoud, M.; Davison, J.S. y Petersen, O.H. (1981) Control of pancreatic cyclic nucleotide levels and amylase secretion by noncolinergic, nonadrenergic nerves: a study employing electrical field stimulation of guinea pig segments. *J. Biol. Chem.* 256, 11025-11031.

Pedersen, P.L. y Carafoli, E. (1989) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends. Biochem.* 12, 146-150.

Peral, M.J.; Calonge, M.L. y Ilundain, A.A. (1995a) Cytosolic pH regulation in chicken enterocytes: Na⁺-independent regulatory cell alkalization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1233, 84-88.

Peral, M.J.; Calonge, M.L. y Ilundain, A.A. (1995b) Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter and intracellular pH regulation in chicken enterocytes. *Pflugers. Arch.* 429, .

Peral, M.J.; Calonge, M.L. y Ilundain, A.A. (1995c) Intracellular pH regulation in chicken enterocytes: the importance of extracellular pH. *Experimental Physiology* 80, 1001-1007.

Peral, M.J.; Cano, M. y Ilundain, A.A. (1995) K⁺-H⁺ exchange activity in brush-border membrane vesicles isolated from chick small intestine. *Eur. J. Biochem.*, 1-5.

Peral, M.J. y Ilundain, A.A. (1995) Proton conductance and intracellular pH recovery from an acid load in chicken enterocytes. *J. Physiol. Lond.* 484 (1), 165-172.

Perkins, P. S.; Bahrami, L. H.; Lenhard, L. W. y Pandol, S. J. (1991) Intracellular mechanisms involved in short-term regulation of net protein synthesis in pancreatic acini. *Biochim. Biophys. Acta*, 1092: 145-152.

Petersen, O.H. (1982) Stimulus excitation coupling in plasma membranes of pancreatic acinar cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 6944, 163-184.

Petersen, O.H. (1992) Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J. Physiol. Lond.* 448, 1-51.

Petersen, O. H. y Iwatsuki, N. (1979) Hormonal control of cell to cell coupling in the exocrine pancreas. 191-202.

Petersen, C. C. H., Petersen, O. H. y Berridge, M. J. (1993) The role of endoplasmic reticulum calcium pumps during cytosolic calcium spiking in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 268, 22262-22264.

Petersen, O.H. y Wakui, M. (1990) Oscillating intracellular Ca^{2+} signals evoked by activation of receptors linked to inositol lipid hydrolysis: mechanism of generation. *J. Membr. Biol.* 118, 93-105.

Pincus, I.J.; Thomas, J.E.; Hausman, D. y Lachman, P.O. (1948) Relationship between the pH of the duodenal content and pancreatic secretion. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 67, 497-500.

Planelles, G.; Anagnostopoulos, T.; Cheval, L. y Doucet, A. (1991) Biochemical and functional characterization of $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in distal amphibian nephron. *Am. J. Physiol.* 260, F806-F812.

Polack, J.M.; Pearse, A.G.E. y Heath, C.M. (1975) Complete identification of endocrine cells in the gastrointestinal tract using semithin-thin sections to identify motilin cells in human and animal intestine. *Gut* 16, 225-226.

Ponnyssegur, J. y Seuwen, K. (1992) Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. *Ann. Rev. Physiol.* 54: 195-210.

Powers, R. E.; Saluja, A. K.; Houlihan, M. J. y Steer, M. L. (1985) Inositol trisphosphate production and amylase secretion in mouse pancreatic acini. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 131: 284-288.

Putney, J.W.Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell. Calcium.* 7, 1-12.

Putney, J.W.Jr. (1988) The role of phosphoinositide metabolism in signal transduction in secretory cells. *J. Exp. Biol.* 139, 135-150.

Putney, J.W.Jr. (1990) Capacitative Ca^{2+} entry revisited. *Cell. Calcium.* 11, 611-624.

Putney, J. T.; Takemura, H.; Hughes, A. R.; Horstman, D. A. y Tharstrup, O. (1989) How do inositol phosphates regulate calcium signaling?. *FASEB J*, 3: 1899-1905.

Quamme, G.A. (1993) Intracellular free Mg^{2+} with pH changes in cultured epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 27, G383-G389.

Raju, B.; Murphy, E.; Levy, L.A.; Hall, R.D. y London, R.E. (1989) A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium. *Am. J. Physiol.* 256, C540-C548.

Rana, R. S. y Hokin, L. E. (1990) Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiological Rev.*, 70: 115-164.

Randriamampita, C. y Tsien, R.Y. (1993) Emptying in intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature London* 364, 809-810.

Rasmussen, H.; Apfeldorf, W.; Barrett, P.; Takuwa, N.; Zawalich, W.; Kreutter, D.; Park, S. y Takuwa, Y. (1986). Inositol lipids: integration of cellular signalling systems. En: "Receptor biochemistry and methodology. Phosphoinositides and receptor mechanisms" Ed. Putney, J.. Alan R. Liss, New York. pp:109-147.

Raufman, J.-P.; Malhotra, R. y Singh, L. (1991) PACAP-38, a novel peptide from ovine hypothalamus, is a potent modulator of amylase release from dispersed acini from rat pancreas. *Regul. Pept.* 36, 121-129.

Reddy, G.P. (1994) Cell cycle: regulatory events in G1--S transition of mamalian cells. *J. Cell. Biochem.* 54: 379-386.

Reus, L. (1987) Cyclic AMP inhibits Cl^-/HCO_3^- exchanger at the apical membrane of *Necturus* gallbladder epithelium. *J. Gen. Physiol.* 90: 173-196.

Rhee, S.G.; Kim, H.; Suh, P.-G. y Choi, W.C. (1991) Multiple forms of phosphoinositide-specific phospholipase C and different modes of activation. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 337-341.

Rhee, S.G.; Suh, P.-G.; Ryu, S.-H. y Lee, S.Y. (1989) Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 244, 546-550.

Richens, C.A. (1945) The innervation of the pancreas. *J. Comp. Neurol.* 82, 223-236.

Rink, T.J.; Tsien, R.Y. y Warner, A.E. (1980) Free calcium in *Xenopus* embryos measured with ion-selective microelectrodes. *Nature London* 253, 658-660.

Robberecht, P.; Colon, T.P. y Gardner, J.D. (1976) Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea-pig. Structural requirements for effects of vasoactive intestinal peptide and secretin on cellular adenosine 3':5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 251, 4635-4639.

Robberecht, P.; Waelbroeck, M.; Noyer, M.; Chatelain, P.; De Neef, P.; Konig, W. y Christophe, J. (1982) Characterization of secretin and vasoactive intestinal peptide receptors in rat pancreatic plasma membranes using the native peptides, secretin-(7-27) and five secretin analogues. *Digestion.* 23, 201-210.

Romani, A.; Marfella, C. y Scarpa, A. (1992) Regulation of Mg^{2+} uptake in isolated rat myocytes and hepatocytes by protein kinase C. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 296, 135-140.

Romani, A. y Scarpa, A. (1992) Regulation of cell magnesium. *Archiv. Biochem. Biophys.* 298(1), 1-12.

Rose, B. y Rick, R. (1978) Intracellular pH, intracellular free Ca^{2+} and junctional cell-cell coupling. *J. Membr. Biol.* 44, 377-415.

Rossier, M. F.; Bird, G. S. J. y Putney, J. W. J. (1991) Subcellular distribution of the calcium-storing inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive organelle in rat liver. *Biochem. J.*, 274: 643-650.

Roos, A. y Boron, F. (1981) Intracellular pH. *Physiological Reviews* 61 (2), 296-434.

Rowley, W.H.; Sato, S.; Huang, S.C.; Collado-Escobar, D.M.; Wang, L.H.; Martinez, J.; Gardner, J.D. y Jensen, R.T. (1990) Cholecystokinin-induced formation of inositol phosphates in pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 259, G655-G665.

Rubin, R.P.; Godfrey, P.P.; Chapman, D.A. y Putney, J.W.J. (1984) Secretagogue-induced formation of inositol phosphates in rat exocrine pancreas. *Biochem. J.* 219, 655-659.

Rutten, W.J.; De Pont, J.J.H.H.M. y Bonting, S.L. (1972) Adenylate cyclase in the rat pancreas properties and stimulation by hormones. *Biochim. Biophys. Acta.* 274, 201-213.

Sachs, G.; Chang, H.H.; Schackmann, R.; Lewin, M. y Saccomani, G. (1976) A nonelectrogenic H pump in plasma membranes of hog stomach. *J. Biol. Chem.* 251, 7690-7698.

Saeki, K.; Seo, S.; Murakami, M. y Ikehara, I. (1981) Effect of histamine on cyclic AMP levels in the submandibular gland. *Agents Actions* 11, 156-157.

Salido, G. M.; Madrid, J. A.; Esteller, A. y Lopez, M. A. (1982). Effect of electrical stimulation of the vagus nerve on the exocrine pancreatic secretion in the chicken. En: "Exogenous and endogenous influences on metabolic and neural control" Ed. Addink y Spronk. Pergamon Press, Oxford. pp:17-18.

Salido, G. M.; Lennard, R.; Singh, J. y Pariente, J. A. (1990) Histamine-evoked amylase secretion is associated with small changes in calcium mobilization in isolated guinea-pig pancreas. *Exp. Physiol.*, 75: 263-266.

Salido, G.M.; Singh, J.; Render, C.L. y Camello, P.J. (1992) Secretagogue-evoked time-course changes on pancreatic juice secretion in the anaesthetized rat. *Gen. Pharmacol.* 23(1), 33-38.

Salido, G.M.; Singh, J. y Camello, P.J. (en prensa) Growth factors and the exocrine pancreas. *Ars Pharmaceutica*.

Saltiel, A.R. y Ohmichi, M. *Curr. Opin. Neurol.* (1993) 3: 352-359.

Sardet, C.; Counillion, L.; Franchini, A. y Pouyssegur, J. (1990) Growth factors induce phosphorylation of the Na⁺/H⁺ antiporter, a glycoprotein of 110 kD. *Science Wash DC* 218, 1219-1221.

Sardet, C.; Fafournoux, P. y Pouyssegur, J. (1991) Alpha-Thrombin, epidermal growth factor and okadaic acid activate the Na^+/H^+ exchanger, NHE1, by phosphorylating a set of common sites. *J. Biol. Chem.* 266, 19166-19171.

Sardet, C.; Franchini, A. y Pouyssegur, J. (1989) Molecular cloning, primary structure and expression of the human growth factor-activatable Na^+/H^+ antiporter. *Cell.* 52, 271-280.

Sarem-Aslani, A.; Klotz, U.; Walker, S. y Wisser, H. (1992) A method for simultaneously investigate histamine-induced cyclic AMP and aminopyrine accumulation in isolated gastric mucosa cells from human biopsies. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 14, 585-591.

Seidler, N. W.; Jona, I.; Vegh, M. y Martonosi, A. (1989) Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264 (30), 17816-17823.

Schaffalitzky de Muckadell, O. B.; Fahrenkrug, J.; Holst, J. J. y Lauritsen, K. B. (1977) Release of VIP by intraduodenal stimuli. *Scand. J. Gastroent.*, 12: 793-799.

Scheurs, V.V.A.M.; Swarts, H.G.P.; de Pont, J.J.H.H.M. y Bonting, S.L. (1976) Role of calcium in exocrine pancreatic secretion. *Biochim. Biophys. Acta.* 436, 664-674.

Schneffel, S.; Banfic, H.; Eckardt, L.; Schulz, G. y Schulz, I. (1988) Acetylcholine and cholecystokinin receptors functionally couple by different G-proteins to phospholipase C in pancreatic acinar cells. *FEBS. Lett.* 230, 125-130.

Schneffel, S.; Profrock, A.; Hinsch, K.-D. y Schulz, I. (1990) Cholecystokinin activates $\text{Gi}1$ - $\text{Gi}2$,- $\text{Gi}3$ - and several Gs-proteins in rat pancreatic acinar cells. *Biochem. J.* 269, 483-488.

Schulz, I. (1981) Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas. En: "Physiology of the gastrointestinal tract" Ed: Johnson, L.R. Raven Press, New York. pp. 795-819.

Schulz, I. y Stolze, H.H. (1980) the exocrine pancreas: the role of secretagogues, cyclic nucleotides and calcium in enzyme secretion. *Annu.Rev.Physiol.* 42, 127-156.

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

Schulz, I.; Thevenod, F. y Dehlinger-Kremer (1989) Modulation of intracellular free Ca^{2+} concentration by IP_3 -sensitive and IP_3 -insensitive nonmitochondrial Ca^{2+} pools. *Cell. Calcium.* 10, 325-336.

Schwartz, M.A. y Lechene, C. (1992) Adhesion is required for protein kinase-dependent activation of the Na^+/H^+ antiporter by platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6138-6141.

Shears, S.B. (1989) Metabolism of the inositol phosphates produced upon receptor activation. *Biochem. J.* 260, 313-324.

Shiratori, K.; Watanabe, S. y Takeuchi, T. (1991) Somatostatin analog, SMS 201-995, inhibits pancreatic exocrine secretion and release of secretin and cholecystokinin in rats. *Pancreas*, 6: 23-30.

Shukla, S.D. y Halenda, S.P. (1991) Phospholipase D in cell signalling and its relationship to phospholipase C. *Life. Sci.* 48, 851-866.

Sibley, D.R.; Benovic, J.L.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1988) Phosphorylation of cell surface receptors: a mechanism for regulating signal transduction pathways. *Endocr. Rev.* 9: 38-56.

Simon, M.I.; Strathmann, M.P. y Gautam, N. (1991) Diversity of G-proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.

Singh, J. (1983) Effects of aminoacids, glucagon, insulin and acetylcholin on cyclic nucleotide metabolism and amylase secretion in isolated mouse pancreatic fragments. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2017-2023.

Singh, J. (1985) Mechanism of action of insulin on acetylcholine-evoked amylase secretion in the mouse pancreas. *J. Physiol. Lond.* 358, 469-482.

Singh, M. (1985) Effect of endorphins on amylase secretion from rat pancreas in vivo and in vitro. *Digestive Diseases and Sciences*, 30: 257-262.

Singh, J. y Pearson, G.T. (1984) Effects of nerve stimulation on enzyme secretion from the in vitro rat pancreas and ³H-release after incubation with catecholamines. *Nauyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* 327, 228-233.

Singh, J.; Salido, G.M.; Camello, P.J.; Lennard, R.; Render, C.; Wisdom, D.; Pozo, M.J. y Pariente, J.A. (1992) Interactions between cholecystokinin-octapeptide and secretin in the rat pancreas in vivo and in vitro. *Exp. Physiol.* 77, 191-204.

Singh, J. y Wisdom, D.M. (1995) Second messenger role of magnesium in pancreatic acinar cells of the rat. *Cell. Biochem.* 149/150, 175-182.

Sjodin, L. (1985) CCK inhibits binding of substance P to pancreatic acinar cells. *Acta Physiol. Scand.*, 124: 471.

Sjodin, L.; Dahlen, H. G.; Lund, P. E. y Gylfe, E. (1990) Stimulation of pancreatic amylase release is associated with a parallel sustained increase of cytoplasmic calcium. *Regulatory Peptides*, 30: 239-253.

Sjodin, L.; Dahlen, H.G. y Gylfe, E. (1991) Calcium oscillations in guinea-pig pancreatic acinar cells exposed to carbachol, cholecystokinin and substance P. *J. Physiol. Lond.* 444, 763-776.

Skulachev, V.P. (1977) Transmembrane electrochemical H⁺ potential as a convertible energy source for the living cell. *FEBS. Lett.* 74, 1-9.

Smith, P.A. y Case, R.M. (1975) Effects of colera toxin on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and secretory processes in the exocrine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta.* 399, 277-290.

Soleimani, M.; Bookstein, C.; McAteer, J.A.; Hattabaugh, Y.J.; Bizal, G.L.; Musch, M.W.; Villereal, M.; Rao, M.C.; Howard, R.L. y Chang, E. (1994) Effect of high osmolarity on Na^+/H^+ exchange in renal proximal tubule cells. *J. Biol. Chem.* 269, 15613-15618.

Solomon, T. E. (1987). Control of pancreatic exocrine secretion. En: "Physiology of the gastrointestinal tract" Ed. Johnson. Raven Press, New York pp:1173-1207.

Solomon, T.E. (1994) Control of exocrine pancreatic secretion En:"Physiology of the gastrointestinal tract" Ed:Johnson, L.R. Raven Press, New York. pp. 1499-1529.

Spiegel, A. M. (1990). Structure and identification of G-proteins: isolation and purification. En: "G-proteins as mediators of cellular signalling processes. Molecular pharmacology of cell regulation. Vol. 1."Ed. Houslay y Milligan. John Wiley & Sons, Chichester. pp:15-30.

Squire, L.V. y Petersen, O.H. (1987) Modulation of Ca^{2+} and voltage activated K^+ channels by internal Mg^{2+} in salivary acinar cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 899, 171-175.

Steenbergen, C.; Deleeuw, G.; Rich, T. y Williamson, J.R. (1977) Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. *Circ. Res.* 41, 849-858.

Stening, G. F. y Grossman, M. I. (1969) Gastrin-related peptides as stimulants of pancreatic and gastric secretions. *Am. J. Physiol.*, 217: 262-265.

Stenson, W.F. y Lobos, E. (1982) Metabolism of arachidonic acid by pancreatic acini: relation to amylase secretion. *Am. J. Physiol.* 242, G493-G497.

Stone, D.K.; Xie, X.-S.; Wu, L.-T. y Racker, E. (1989) Proton translocating ATPases of clathrin coated vesicles, renal medulla and Ehrlich En:"Hydrogen ion transport in epithelia" Ed:Forte, J. y Rector, F.C. Wiley, New York. .

Strange, K. (1994) Are all cell volume changes the same? *NIPS* 9, 223-228.

Strange, K. y Jackson, P.S. (In press) Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channels. *Kidney Int.*, .

Strathmann, M. y Simon, M.I. (1990) G-protein diversity: a distinct class of alpha-subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9113-9117.

Streb, H.; Bayerdorffer, E.; Haase, W.; Irvine, R.F. y Schulz, I. (1984) Effect of inositol-1,4,5-trisphosphate on isolated subcellular fractions of rat pancreas. *J. Membr. Biol.* 81, 241-253.

Streb, H.; Heslop, J. P.; Irvine, R. F.; Schulz, I. y Berridge, M. J. (1985) Relationship between secretagogue-induced Ca^{2+} release and inositol polyphosphate production in permeabilized pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.*, 260: 7309-7315.

Streb, H.; Irvine, R.F.; Berridge, M.J. y Schulz, I. (1983) Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature London* 306, 67-69.

Streb, H. y Schulz, I. (1983) Regulation of cytosolic free Ca^{2+} concentration in acinar cells of rat pancreas. *Am. J. Physiol.* 245, G347-G357.

Stuenkel, E.L.; Tsunoda, Y. y Williams, J.A. (1989) Secretagogue-induced calcium mobilization in single pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 863-869.

Sullivan, J.F.; Burch, R.E. y Magee, D.F. (1974) Enzyme activity and divalent cation content of pancreatic juice. *Am. J. Physiol.* 226, 1420-1423.

Sullivan, J.F.; Burch, R.E. y Megee, D.F. (1976) Enzymatic activity and divalent cation content of the pancreatic juice. *Am. J. Physiol.* 226, 1420-1423.

Sung, C. K. y Williams, J. A. (1988) Role of calcium in pancreatic acinar cell secretion. *Mineral Electrolyte Metab.*, 14: 71-77.

Supattapone, S.; Danoff, S.K.; Theibert, A.; Joseph, S.K.; Steiner, J. y Snyder, S.H. (1988) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8747-8750.

Supattapone, S.; Worley, P. F.; Baraban, J. M. y Snyder, S. H. (1988) Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.*, 263: 1530-1534.

Susumu, T. (1977) *The pancreas En: "Histology"* Ed: Weis, L. y Greep, R.O. MacGraw Hill, . pp. 747-764.

Swandito, L.; Leung, Y. K.; Firmansyah, A.; Lebenthal, E. y Lee, P. C. (1989) Phorbol ester potentiates VIP-stimulated amylase release in rat pancreatic acini. *Pancreas*, 4: 459-463.

Swanson, C.H. y Solomon, A.K. (1975) Micropuncture analysis of the cellular mechanisms of electrolyte secretion by the in vitro rabbit pancreas. *J. Gen. Physiol.* 65, 22-45.

Tang, W.-J.; Krupinski, J. y Gilman, A.G. (1991) Expression and characterization of calmodulin-activated (Type I) adenylcyclase. *J. Biol. Chem.* 266, 8595-8603.

Tankel, H.I.; Lester, L.J.; Richman, A. y Hollander, F. (1957) A study of the pancreatic response to histamine in dogs with total gastrectomies. *Gastroenterology.* 32, 642-650.

Taparel, D.; Susini, C.; Esteve, J. P.; Diaz, J.; Cazaubon, C.; Vaysse, N. y Ribet, A. (1985) Somatostatin analogs: correlation of receptor affinity with inhibition of cyclic AMP formation in pancreatic acinar cells. *Peptides*, 6: 109-114.

Taylor, C. W.; Merritt, J. E.; Putney, J. W. y Rubin, R. P. (1986) Effects of Ca²⁺ on phosphoinositide breakdown in exocrine pancreas. *Biochem. J.*, 238: 765-772.

Taylor, S.S.; Buechler, J.A. y Yonemoto, W. (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 971-1005.

Tepikin, A.V.; Llopis, J.; Snitsarev, V.A.; Gallacher, D.V. y Petersen, O.H. (1994) The droplet technique: measurement of calcium extrusion from single isolated mammalian cells. *Pflugers. Arch.* 428, 664-670.

Tepikin, A.V.; Voronina, S.G.; Gallacher, D.V. y Petersen, O.H. (1992a) Acetylcholine-avoked increase in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration and Ca^{2+} extrusion measured simultaneously in single mouse pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 267, 3569-3572.

Tepikin, A.V.; Voronina, S.G.; Gallacher, D.V. y Petersen, O.H. (1992b) Pulsatile Ca^{2+} extrusion from single pancreatic acinar cells during receptor-activated cytosolic Ca^{2+} spiking. *J. Biol. Chem.* 267, 14073-14076.

Thevenod, F.; Dehlinger-Kremer, M.; Kemmer, T.P.; Christian, A.-L.; Potter, B.V.L. y Schulz, I. (1989) Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive (IsCaP) and insensitive (IisCaP) nonmitochondrial pools in pancreatic acinar cells. *J. Membr. Biol.* 109, 173-186.

Thomas, J.A.; Buchsbaum, R.N.; Zimniak, A. y Racker, E. (1979) Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumour cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry.* 18, 2210-2218.

Thomas, R.C. (1974) Intracellular pH of snail neurones measured with a new pH-sensitive glass microelectrode. *J. Physiol. Lond.* 238, 159-180.

Thomas, R.C. (1986) Intracellular pH En: "Acid-Base balance" Ed: Hainsworth, R. Manchester University Press, Manchester. pp. 50-74.

Thorn, P.; Gerasimenko, O. y Petersen, O.H. (1994) Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic Ca^{2+} oscillations in pancreatic acinar cells. *Embo. J.* 13 (9), 2038-2043.

Toescu, E.C.; Gardner, J.M. y Petersen, O.H. (1993) Mitochondrial Ca^{2+} uptake at submicromolar $[Ca^{2+}]_i$ in permeabilized pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 854-859.

Toescu, E.C.; Lawrie, A.M. y Petersen, O.H. (1992) Spatial and temporal distribution of agonist-evoked cytoplasmic Ca^{2+} signals in exocrine acinar cells analyzed by digital image microscopy. *Embo. J.* 11, 1623-1629.

Tosecu, E. C.; Petersen, O. H. (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.

Tranberg, K. G.; Tabata, K.; Chen, M. H.; Murphy, R. F.; Fischer, J. E. y Joffe, S. N. (1985) Release of secretin immunoreactivity from the ileum. *Ann. Surg.*, 201: 300-304.

Tremblay, J.; Gerzer, R. y Hamet, P. (1988) Cyclic GMP and cell function En: "Advances in second messenger and phosphoprotein research" Ed:Greengard, P. y Robinson, G.A. Raven Press, New York. pp. 319-382.

Trimble, E.R.; Bruzzone, R.; Meehan, C.J. y Biden, T.J. (1987) Rapid increases in inositol-1,4,5-trisphosphate and cytosolic free Ca^{2+} in agonist-stimulated pancreatic acini of the rat. *Biochem. J.* 242, 289-292.

Tse, C.M.; Levine, S.A.; Yun, C.H.C.; Brant, S.R.; Pouyssegur, J.; Montrose, M.H. y Donowitz, M. (1993) Functional characteristics of cloned epithelial Na/H^+ exchanger (NHE3): resistance to amiloride and inhibition by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 9110-9114.

Tse, C.M.; Levine, S.A.; Yun, C.H.C.; Montrose, M.H.; Little, P.L.; Pouyssegur, J. y Donowitz, M. (1993) Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropyl-amiloride-resistant epithelial Na^+/H^+ exchanger isoform (NHE2). *J. Biol. Chem.* 268, 11917-11924.

Tse, C.M.; Ma, A.I.; Yang, V.W.; Watson, A.J.M.; Levine, S.; Montrose, M.H.; Potter, J.; Sardet, C.; Pouyssegur, J. y Donowitz, M. (1991) Molecular cloning of cDNA encoding the rabbit ileal villus cell basolateral membrane Na^+/H^+ exchanger. *Embo. J.* 10, 1957-1967.

Tse, C.-M.; Levine, S.A.; Yun, C.H.C.; Brant, S.R.; Nath, S.; Pouyssegur, J. y Donowitz, M. (1994) Molecular properties, kinetic and regulation of mammalian Na^+/H^+ exchangers. *Cell. Physiol. Biochem.* 4, 282-300.

Tsien, R. W. y Tsien, R. Y. (1990) Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6: 715-760.

Tsunoda, Y. (1990) Cytosolic free calcium spiking affected by intracellular pH change. *Exp. Cell Res.*, 188, 294-301.

Tsunoda, Y. (1993) Receptor-operated Ca^{2+} signaling and crosstalk in stimulus secretion coupling. 1154, 105-156.

Tsunoda, Y.; Stuenkel, E.L. y Williams, J.A. (1990a) Characterization of sustained $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in pancreatic acinar cells and its relation to amylase secretion. *Am. J. Physiol.* 259, G279-G801.

Tsunoda, Y.; Stuenkel, E.L. y Williams, J.A. (1990b) Oscillatory model of calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.* 258, C147-C155.

Van De Put, F.H.M.M.; De pont, J.J.H.H.M. y Willems, P.H.G.M. (1991) GTP-sensitivity of the energy-dependent Ca^{2+} storage pool in permeabilized pancreatic acinar cells. *Cell. Calcium.* 12, 587-598.

Vandermeers, A.; Vandemeers-Priet, M. C.; Rathe, J.; Kutzner, R.; Delforge, A. y Christophe, J. (1977) A calcium-dependent protein activator of guanosine-3'5'-monophosphate phosphodiesterase in bovine and ratpancreas. *Eur. J. Biochem.*, 81: 377-386.

Vandermeers, A.; Vandermeers-Piret, M.C.; Rathe, J.; Dehaye, J.P.; Winand, J. y Christophe, J. (1984) Phosphorylation of 3 particulate proteins in rat pancreatic acini in response to vasoactive intestinal peptide (VIP), secretin and cholecystokinin (CCK-8). *Peptides* 5, 359-365.

Van-Leemput-Coutrez, M.; Camus, J. y Christophe, J. (1973) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases of the rat pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 182-190.

Varga, G.; Papp, M. y Vizi, S. (1990) Cholinergic and adrenergic control of enzyme secretion in isolated rat pancreas. *Dig. Dis. Sci.*, 35: 501-507.

Vasington, F.D.; Gazzotti, P.; Tiozzo, R. y Carafoli, E. (1972) 1972. *Biochim. Biophys. Acta.* 256, 43-54.

Volpe, P.; Krause, K.-H.; Hashimoto, S.; Zorzato, F.; Possan, T.; Meldolisei, J. y Lew, D.P. (1986) "Calciosome", a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store of nonmuscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 1091-1095.

Wacker, W.E.C. (1968) The biochemistry and physiology of magnesium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 162, 717-726.

Wacker, W.E.C. (1980): *Magnesium and Man.* Harvard University Press, Cambridge, MA (USA).

Wagner, A.C.C.; Wishart, M.J.; Yule, D.I. y Williams, J.A. (1992) Effects of okadaic acid indicate a role for dephosphorylation in pancreatic stimulus-secretion coupling. *Am. J. Physiol.* 63, C.

Wagner, A.C.C.S., C y Williams, J.A. (1992) Effects of calyculin A on amylase release in streptolysin-O permeabilized acinar self. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189(3), 1606-1612.

Wakabayashi, S.; Bertrand, B.; Shigekawa, M.; Fafournoux, P. y Pouyssegur, J. (1994) Growth factor activation and "H⁺-sensing" of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1). *J. Biol. Chem.* 269, 5583-5587.

Wakabayashi, S.; Fafournoux, P.; Sardet, C. y Pouyssegur, J. (1992) The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H⁺-sensing". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 2424-2428.

Wakui, M.; Osipchuk, Y.V. y Petersen, O.H. (1990) Receptor-activated cytoplasmic Ca^{2+} spiking mediated by inositol trisphosphate is due to Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Cell*. 63, 1025-1032.

Wakui, M. y Petersen, O.H. (1990) Cytoplasmic Ca^{2+} oscillations evoked by acetylcholine or intracellular infusion of inositol triphosphate or Ca^{2+} can be inhibited by internal Ca^{2+} . *FEBS. Lett.* 263, 206-208.

Wakui, M.; Potter, B.V.L. y Petersen, O.H. (1989) Pulsatile intracellular calcium release does not depend on fluctuations in inositol triphosphate concentration. *Nature London* 339, 317-320.

Walz, B. y Baumann, O. (1989). Calcium-sequestering cell organelles: in situ localization, morphological and functional characterization. En: "Progress in histochemistry and cytochemistry. Vol. 20, n 2" Ed. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York.

Walsh, J. H. (1987). Gastrointestinal hormones. En: "Physiology of the gastrointestinal tract" Ed. Johnson. Raven Press, New York pp:181-253.

Warashina, A. (1992) Calcium mobilization and catecholamine secretion in histamine-stimulated rat adrenal medullary cells. *Biomedical Research* 13, 415-421.

Warnock, D.G. y Rector, F.C. (1979) Proton secretion by the kidney. *Annu.Rev.Physiol.* 41, 197-210.

Washburn, E.W. (1908) The theory and practice of the iodometric determination of arsenious acid. *J. Am. Chem. Soc.* 30, 31-46.

Wahl, M.I.; Nishibe, S.; Suh, P-G.; Rhee, S.G. y Carpenter, G. (1989) Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II independently of receptor internalization and extracellular calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 1568-1572.

Wenzl, E.; Sjaastad, M.D.; Weintraub, W.H. y Machen T.E. (1989) Intracellular pH regulation in IEC-6cells, a cryplike intestinal cell line. *Am. J. Physiol.* 257: G732-G740.

Wess, J.; Bonner, T.I.; Dorje, F. y Brann, M.R. (1990) Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers. *Mol. Pharmacol.* 38, 517-523.

Willems, P.H.G.M.; Van Den Broek, B.A.M.; Van Os, C.H. y De Pont, J.J.H.H.M. (1989) Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate -induced Ca^{2+} release in permeabilized pancreatic acinar cells by hormonal and phorbol ester pretreatment. *J. Biol. Chem.* 264, 9762-9767.

***Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3ª
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>