

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA DE CACERES**

---

**IMPLICACIONES DE LA TIROSINA CINASA p125<sup>FAK</sup> EN  
PROCESOS DE SECRECION PANCREATICA**

*Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Veterinaria por la  
Universidad de Extremadura por:*

**D. JUAN ANTONIO ROSADO DIONISIO**

**Cáceres, Diciembre 1997**



**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**



**Facultad de Veterinaria**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

Campus Universitario  
Avda. Universidad s/n  
E-10071-Cáceres (Spain)  
Tel.: +34 927 257155  
Fax: +34 927 257110

GINES MARIA SALIDO RUIZ, Catedrático de Fisiología del Departamento de Fisiología de la UEX y LUIS JESUS GARCIA MARIN, Profesor Titular de Fisiología del Departamento de Fisiología de la UEX

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, presentada por D. Juan Antonio Rosado Dionisio, con el título "Implicaciones de la tirosina cinasa p125<sup>FAK</sup> en procesos de secreción pancreática" ha sido realizada, bajo su dirección, en el Departamento de Fisiología de la UEX, y entendiendo que se halla finalizada y que reúne los requisitos de originalidad, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

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

Fdo. Ginés M. Salido Ruiz

Fdo. Luis J. García Marín

Este trabajo ha sido realizado con cargo al Proyecto de Investigación subvencionado por la DGICYT (PB94-1416-C02-02) y con la ayuda de una Beca de Formación de Profesorado Universitario y Personal Investigador concedida por el Ministerio de Educación y Cultura.

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas sin cuya ayuda no hubiera sido posible realizar esta Tesis Doctoral, y de forma muy especial:

A los *Drs. D. Ginés María Salido Ruiz*, Catedrático y Director del Departamento de Fisiología, y *D. Luis Jesús García Marín*, porque gracias a su orientación, acertada dirección y el empeño puesto en mi formación he logrado finalizar esta Tesis Doctoral. Además, a Ginés por haberme introducido en el campo de la investigación, por la confianza que depositó en mi y por el constante aliento y consejos con que me ha ayudado desde mi llegada al Departamento. A Luis, por el incansable interés y dedicación que siempre mostró en mi trabajo y por transmitirme su entusiasmo, que supuso un estímulo constante durante la realización de este trabajo.

A la *Dra. D<sup>a</sup> María José Pozo Andrada*, Catedrática en la Escuela de Enfermería de Cáceres, por su amistad y sus constantes palabras de ánimo.

Al *Dr. D. José Antonio Pariente Llanos*, por su amabilidad, su apoyo y la sincera ayuda que me ha brindado siempre que le he necesitado.

Al *Dr. D. Pedro Javier Camello Almaraz*, por las motivadoras conversaciones que ha mantenido conmigo, su ayuda y la confianza que siempre depositó en mi.

A mis compañeros, y ante todo amigos, del grupo de investigación: *Antonio González Mateos, Ana Isabel Lajas Petisco, Soledad Alcón González, Cristina Camello Almaraz y José Antonio Tapia García* y la Técnico Especialista *M<sup>a</sup> Mercedes Gómez Blázquez*, por las gratas horas de trabajo que hemos compartido y los buenísimos momentos que hemos pasado juntos.

Al *Dr. Robert T. Jensen*, Jefe de la Sección de Enfermedades Digestivas del National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases, National Institutes of Health en Bethesda (Estados Unidos), en cuyos laboratorios tuve la oportunidad de aprender y desarrollar algunas de las técnicas empleadas en la realización de esta Tesis.

A las *Unidades de Bioquímica y Genética y Mejora Animal de la Facultad de Veterinaria de Cáceres*, con cuya valiosa ayuda y cooperación conté en todo momento.

Al *Ministerio de Educación y Cultura*, por haberme concedido una Beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario y Personal Investigador (Ref: AP94 28942443), gracias a la cual ha sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A la *Junta de Extremadura*, por concederme ayudas para la asistencia a Congresos y contribuir, por tanto, a mi formación.

A *mis padres y hermano* y a *Gemma*, por haber estado siempre a mi lado, por las palabras de aliento, la ilusión que han derrochado y el saber estar en los buenos momentos y en los difíciles. Siempre estuvieron presentes y por tanto, esta Tesis Doctoral va dedicada a ellos.

*A todos y cada uno de ellos MUCHAS GRACIAS.*

*A mis padres y hermano*

*A Gemma*

***ABREVIATURAS Y SIMBOLOS UTILIZADOS***

4-DAMP: 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina metiodida.

8-Br-AMPC: 8-bromo adenosina-3',5'-monofosfato cíclico.

ACh: Acetilcolina.

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico.

ANOVA: Análisis de la varianza.

APS: Persulfato amónico.

bFGF: Fragmento básico del factor de crecimiento de los fibroblastos.

BSA: Albúmina sérica bovina.

$[Ca^{2+}]_i$ : concentración intracelular de ion calcio.

CaM:  $Ca^{2+}$ -calmodulina.

CCK-8: Colecistocinina octapéptido.

CCK<sub>A</sub>: Receptor de la CCK tipo A.

CICR: Liberación de ion calcio inducida por ion calcio.

DAG: 1,2-Diacilglicerol.

DTT: Ditiotreitól.

EC50: Concentración eficaz 50.

EDTA: Ácido etilén diamino tetraacético.

EEM: Error estándar de la media.

EGF: Factor de crecimiento epidermal.

EGTA: Ácido etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)N,N,N',N' tetraacético.

EM: Efecto máximo.

FAK: Tirosina cinasa de adhesión focal.

FGF: Factor de crecimiento de los fibroblastos.

FRNK: Proteína no cinasa relacionada con la FAK.

GAP: Proteína activadoras de GTPasas.

GDI: Factores inhibidores de la disociación de GDP.

GEF: Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina.

GH: Hormona de crecimiento.

GMPc: Guanosin monofosfato cíclico.

GRP: Péptido liberador de gastrina.

[<sup>3</sup>H]NMS: [N-metil-<sup>3</sup>H]escopolamina.

[<sup>3</sup>H]QNB: [<sup>3</sup>H]quincilidilil benzilato.

IBMX: 3-Isobutil-1-metilxantina

ICAM: Moléculas de adhesión intracelular.

IGF: Factor de crecimiento tipo insulina.

IgG: Inmunoglobulina G.

Ins(1)P: 1-Fosfato de inositol.

Ins(3)P: 3-Fosfato de inositol.

Ins(4)P: 4-Fosfato de inositol.

Ins(1,4)P<sub>2</sub>: 1,4 Difosfato de inositol.

Ins(3,4)P<sub>2</sub>: 3,4 Difosfato de inositol.

Ins(4,5)P<sub>2</sub>: 4,5 Difosfato de inositol.

Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>: 1,4,5 Trifosfato de inositol.

Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>: 1,3,4,5 Tetrafosfato de inositol.

Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>: 1,3,4,6 Tetrafosfato de inositol.

Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>: 1,3,4,5,6 Pentafosfato de inositol.

IP<sub>6</sub>: Hexafosfato de inositol.

JMV-180: Boc-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-2-feniletil éster.

K<sub>d</sub>: Constante de disociación.

KRH: Krebs Ringer Hepes.

LPA: Ácido lisofosfatídico.

MAP: Proteínas asociadas a los microtúbulos. Proteínas activadas por la mitogénesis.

MAP cinasas: Proteínas cinasas de las MAP.



MAPKAP: Proteínas activadas por las MAP cinasas.

MLCK: Cinasa de la cadena ligera de miosina.

NMB: Neuromedina B.

PACAP: Polipéptido de pituitaria activador de la adenilato ciclasa.

PBS: Tampón fosfato salino.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

PHI: Péptido histidina-isoleucina.

PI3-cinasa: Fosfatidilinositol 3 cinasa.

PIP-5 cinasa: fosfatidilinositol 5 cinasa.

PKA: Proteína cinasa A.

PKC: Proteína cinasa C.

PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasa A<sub>2</sub>.

PLC: Fosfolipasa C.

PLD: Fosfolipasa D.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PP: Polipéptido pancreático.

RER: Retículo endoplásmico rugoso.

SDS: Lauril sulfato sódico.

SNC: Sistema nervioso central.

TGF: Factor de crecimiento transformante.

TPA: 13, Acetato de 12, O-tetradecanoil forbol.

VCAM: Moléculas de adhesión a las células vasculares.

VIP: Péptido intestinal vasoactivo.

v-Src: Virus del Sarcoma de Rous.

WASP: Proteína implicada en el síndrome de inmunodeficiencia de Wiskott-Aldrich.

# ÍNDICE

---

<b>CAPÍTULO PRIMERO: INTRODUCCIÓN GENERAL AL</b>	
<b>PÁNCREAS EXOCRINO</b> .....	1
<b>1.1. ANATOMÍA GENERAL Y ESTRUCTURA DEL</b>	
<b>PANCREAS</b> .....	2
<b>1.2. RECEPTORES PRESENTES EN LAS CÉLULAS</b>	
<b>ACINARES PANCREÁTICAS</b> .....	6
<b>1.2.1. Receptores con función secretora</b> .....	5
<b>1.2.2. Receptores sin función secretora</b> .....	17
<b>1.3. MECANISMOS DE ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-RESPUESTA</b>	
<b>EN EL PÁNCREAS EXOCRINO</b> .....	22
<b>1.3.1. Señales transmembranales</b> .....	22
<b>1.3.2. Mensajeros intracelulares</b> .....	24
<b>CAPÍTULO SEGUNDO: METODOLOGÍA GENERAL</b> .....	37
<b>2.1. LISTA DE REACTIVOS</b> .....	38
<b>2.2. ANIMALES DE ESTUDIO</b> .....	41
<b>2.3. MÉTODO DE AISLAMIENTO DE ACINOS PANCREÁTICOS</b> .....	41
<b>2.4. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE AMILASAS</b> .....	45
<b>2.5. DETERMINACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE</b>	
<b>PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE TIROSINA</b> .....	48
<b>2.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO</b> .....	57
<b>CAPÍTULO TERCERO: TIROSINAS CINASAS. LA</b>	
<b>p125<sup>FAK</sup></b> .....	58
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	59
<b>3.1.1. Las proteínas tirosinas cinasas</b> .....	59
<b>3.1.2. La p125<sup>FAK</sup></b> .....	63
<b>3.1.3. La paxilina</b> .....	76

---

<b>3.2. METODOLOGÍA</b> .....	81
<b>3.3. RESULTADOS</b> .....	83
<b>3.3.1. Identificación de la FAK y la paxilina utilizando anticuerpos específicos</b> .....	83
<b>3.3.2. Efecto del carbacol en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina</b> .....	85
<b>3.3.3. Efecto de la CCK-8 en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina</b> .....	90
<b>3.3.4. Estudio de los mecanismos intracelulares que median el efecto del carbacol y la CCK-8</b> .....	101
<b>3.3.5. Efecto del VIP y de la secretina en la fosforilación de la FAK y la paxilina. Vía del AMP cíclico</b> .....	115
<b>3.4. DISCUSIÓN</b> .....	117
 <b>CAPÍTULO CUARTO: LOS CONTACTOS FOCALES.</b>	
<b>EL CITOESQUELETO</b> .....	123
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	123
<b>4.1.1. Las placas de adhesión focal</b> .....	124
<b>4.1.2. El citoesqueleto</b> .....	129
<b>4.1.3. Familia de GTPasas de bajo peso molecular Rho</b> .....	139
<b>4.1.4. Regulación de la formación de las placas de adhesión focal y las fibras de tensión de actina</b> .....	141
<b>4.2. METODOLOGÍA</b> .....	144
<b>4.3. RESULTADOS</b> .....	145
<b>4.3.1. Implicación de los filamentos de actina en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina</b> .....	145
<b>4.3.2. Implicación de los microtúbulos en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina</b> .....	159
<b>4.3.3. Implicación de Rho en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina</b> .....	148
<b>4.4. DISCUSIÓN</b> .....	151

**CAPÍTULO QUINTO: IMPLICACIONES DE LA TIROSINA****CINASA FAK EN LOS PROCESOS DE SECRECIÓN****PANCREÁTICA. DISCUSIÓN GENERAL.....153****5.1. INTRODUCCIÓN .....154****5.2. METODOLOGÍA.....160****5.3. RESULTADOS .....161****5.3.1. Estimulación de la secreción de amilasas en  
acinos pancreáticos .....161****5.3.2. Papel de las tirosinas cinasas en el proceso de  
secreción de amilasas .....165****5.3.3. Papel de las tirosinas cinasas en la fosforilación  
en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina.....171****5.3.4. Implicación de las proteínas de la familia Rho  
en la secreción de amilasas en respuesta a distintos  
secretagogos .....173****5.3.5. Papel de las tirosinas cinasas en la respuesta a la  
estimulación con TPA .....179****5.3.6. Papel de los filamentos de actina en la secreción  
pancreática y la fosforilación de la FAK y la paxilina en  
residuos de tirosina.....182****5.4. DISCUSIÓN GENERAL .....187****CONCLUSIONES.....194****BIBLIOGRAFÍA.....196**

*CAPÍTULO 1*

*INTRODUCCIÓN GENERAL AL PÁNCREAS EXOCRINO*

### **1.1. ANATOMÍA GENERAL Y ESTRUCTURA DEL PÁNCREAS**

El páncreas es una glándula tubuloacinar compuesta, ubicada en la posición craneal de la cavidad abdominal. Se localiza generalmente detrás del estómago, en una posición metaperitoneal, extendiéndose desde el bazo hasta el duodeno.

El páncreas de la rata presenta una estructura difusa de color rosáceo. El peso de la glándula oscila entre 550 mg (para una rata de 100g de peso) y 1g (para una rata de 300g de peso) (Hebel y Stromberg, 1976). El páncreas no tiene un tejido conectivo bien definido, pero está cubierto por una fina película de tejido laxo que, en determinados tramos, se introduce en la glándula formando septos que la subdividen en pequeños lóbulos.

El principal conducto excretor en el páncreas de la rata, el conducto pancreático, que desemboca en el conducto colédoco, común para las secreciones pancreática y hepática, se extiende a lo largo de toda la glándula ramificándose en cortos conductos interlobulares a donde drena cada lóbulo los productos de la secreción. Los conductos interlobulares se ramifican en conductos intralobulares los cuales emiten un gran número de ramas intercalares que llegan hasta el acino pancreático (Susumu, 1977). Los productos de la secreción del páncreas son vehiculados por el conducto pancreático hasta el duodeno, donde participan en la digestión enzimática de las proteínas, grasas y carbohidratos.

La sangre arterial que riega el páncreas procede de las arterias celiaca y mesentérica craneal. Dichas arterias envían ramas hacia el tejido glandular que se introducen adyacentes a los conductos y túbulos pancreáticos. El drenaje venoso se realiza a través de las venas mesentérica craneal y celiaca que se integran al tronco de la vena porta (Gorelick y Jamieson, 1987). El sistema linfático del páncreas drena al linfocentro celíaco, que agrupa a los ganglios linfáticos esplénicos y pancreátoduodenales (Sandoval, 1975).

El sistema nervioso del páncreas consta de un sistema extrínseco y otro intrínseco.

**La inervación extrínseca** la lleva a cabo el sistema nervioso autónomo, con ramas tanto parasimpáticas como simpáticas (Gorelick y Jamieson, 1987). La inervación parasimpática corre a cargo del tronco ventral del nervio vago (Ribet y cols., 1985). La inervación simpática accede al páncreas por las paredes arteriales, inervando de este modo la red vascular pancreática (Bockman, 1993).

**La inervación intrínseca** está constituida por plexos con pequeños ganglios interconectados localizados principalmente en el tejido conectivo interlobular (Gorelick y

Jamieson, 1987). A estos ganglios llegan fibras nerviosas vagales y fibras simpáticas. Dichas fibras contienen mayoritariamente neuronas colinérgicas, aunque también se componen de neuronas peptidérgicas (Gorelick y Jamieson, 1987; Case y Argent, 1993).

El páncreas es una estructura exocrina y endocrina, donde la porción exocrina de la glándula constituye la mayor parte de la misma (84%). Las células ductulares y los vasos sanguíneos constituyen el 4% de la glándula, mientras que la porción endocrina supone sólo un 2% del peso del páncreas. El resto de la masa del órgano lo constituye la matriz extracelular (10%) (Gorelick y Jamieson, 1987).

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

### ***EL ACINO PANCREÁTICO***

El acino pancreático es una estructura formada por grupos celulares que tiende a adoptar forma esférica, ovoide o tubular corta. Está formado por una única capa de células epiteliales con forma piramidal cuyo polo apical (vértice) asoma a la luz acinar presentando cortas microvellosidades, en tanto que su base descansa sobre una fina membrana basal de tejido conectivo (Gorelick y Jamieson, 1987).

El acino lo componen fundamentalmente células acinares propiamente dichas, aunque también aparecen células centroacinares (Bloom y Fawcet, 1981). El diámetro de la luz acinar varía en función de la actividad secretora, siendo menor cuando el acino está en reposo (Bloom y Fawcet, 1981).

Ultraestructuralmente, la célula acinar, especializada en la secreción enzimática, presenta un retículo endoplásmico rugoso (RER) muy desarrollado y un gran número de mitocondrias (Gorelick y Jamieson, 1987). El citoplasma es basófilo y es muy evidente la presencia de gran cantidad de gránulos de zimógeno acidófilos y localizados en las proximidades de la membrana apical de las células (Gorelick y Jamieson, 1987; Schulz, 1987). El tamaño de los gránulos de zimógeno puede variar en función del grado de desarrollo y la estimulación por agentes neurohormonales (Gorelick y Jamieson, 1987). El aparato de Golgi se localiza en la región supranuclear, aunque dicha localización y su tamaño depende de la actividad fisiológica (Bloom y Fawcet, 1981).

Las células acinares adyacentes están unidas por complejos de conjunción situados en la membrana plasmática, en las proximidades de la región apical de la célula (Schulz, 1987). Estos



complejos incluyen zónulas de adherencia, desmosomas, unas estructuras denominadas "tight junctions" y los "gap junctions". A través de ellos pueden pasar pequeñas moléculas que podrían así coordinar la función de las células vecinas.

### ***LA CÉLULA CENTROACINAR***

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

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

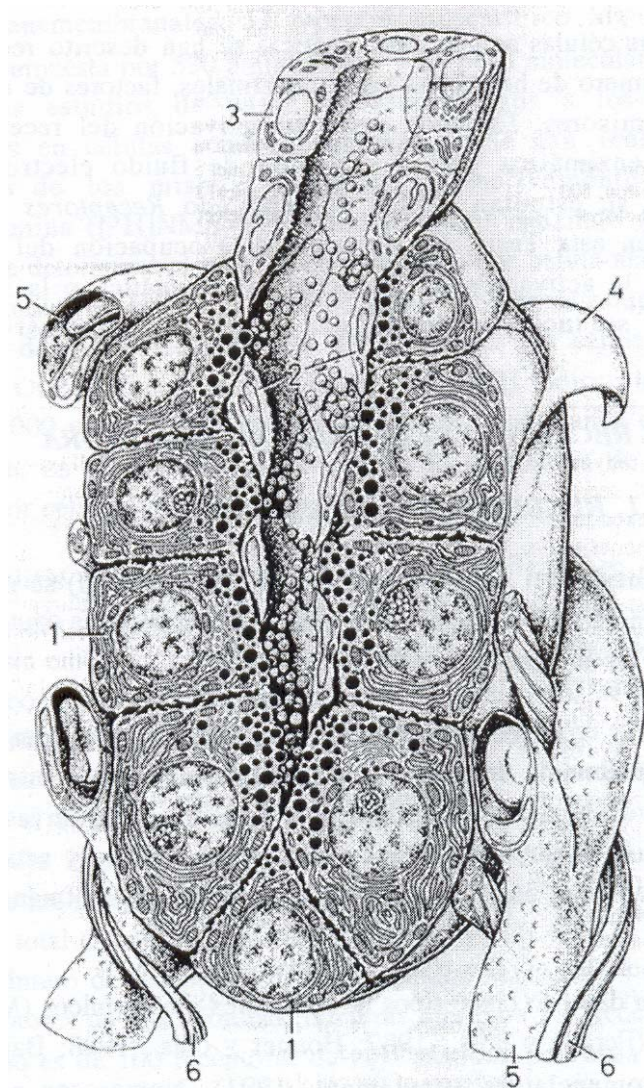
### ***EL SISTEMA DUCTULAR***

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

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

La estructura de la célula ductular es muy similar a la de la célula centroacinar. Ambas presentan microvellosidades en el borde libre. Sin embargo, la membrana basolateral, lisa en las células centroacinares, presenta interdigitaciones en los conductos intralobulares (Kern, 1986). El citoplasma de la célula ductular parece cuasivacío, en contraste con el de la célula acinar. Presenta pocas mitocondrias, un aparato de Golgi poco desarrollado y un pequeño RER. Los conductos pancreáticos están rodeados por una densa capa de tejido conectivo. Por este tejido discurren arterias, venas, vasos linfáticos y células nerviosas del sistema simpático (Kern, 1986). El conjunto de acinos con sus conductos intercalares e intralobulares constituyen un

lóbulo o lobulillo pancreático, que se encuentran separados entre sí por tejido conectivo (Bockman, 1993).



Esquema de un acino pancreático: **1** Célula acinar. **2** Célula centroacinar. **3** Células de los conductos intercalares. **4** Membrana basal. **5** Capilares sanguíneos. **6** Fibra nerviosa. Tomado de *Physiology of the gastrointestinal tract* . 1987. Second edition. Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas. Schulz I. pp 1147-1171.

## **1.2. RECEPTORES PRESENTES EN LAS CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS**

En las células acinares pancreáticas se han descrito receptores para un gran número de hormonas gastrointestinales, factores de crecimiento y neurotransmisores. En unos casos la activación del receptor provoca secreción enzimática y/o la secreción de fluido electrolítico; estos receptores se estudian dentro del apartado *Receptores con función secretora* en esta Tesis. En otros casos la ocupación del receptor no conduce a la activación de la secreción enzimática o la inhibe; estos receptores se incluyen dentro del apartado *Receptores sin función secretora*.

### **1.2.1. RECEPTORES CON FUNCIÓN SECRETORA**

#### **1.2.1.1. RECEPTORES COLINÉRGICOS**

La función del neurotransmisor acetilcolina (ACh) se manifiesta en el acino pancreático a través de la activación de receptores muscarínicos localizados en la membrana celular.

La ACh es un neurotransmisor que ocasiona una gran cantidad de efectos ampliamente descritos en el páncreas exocrino, entre los que se encuentran: estimulación de la secreción de enzimas digestivas, incremento de la secreción de jugo pancreático rico en ion cloruro y activación de la síntesis de enzimas pancreáticos (ver la revisión de Hootman y Williams, 1987).

Se han descrito cinco tipos de receptores muscarínicos (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub>) (Peralta y cols., 1987; Bonner y cols., 1988; Barnard, 1988; Receptor nomenclature supplement, 1991). Numerosos estudios han evidenciado la presencia de receptores muscarínicos en las células acinares pancreáticas de todas las especies examinadas, incluyendo al hombre, rata, perro, cobaya, ratón, gato y conejo (Gardner y Jackson, 1977; Peikin y cols., 1978; Bommelaer y cols., 1981; Dehaye y cols., 1984; Susini y cols., 1986; Peralta y cols., 1988; Barnard, 1988). El estudio del ARN por Northern blotting indicó que el único receptor presente en células acinares pancreáticas de rata es el M<sub>4</sub> (Jensen, 1994), receptor que actualmente se denomina receptor M<sub>3</sub> (Waelbroeck y cols., 1996) por lo que se citará de este modo en adelante. Los receptores muscarínicos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a las proteínas G de membrana con siete dominios transmembranales. El receptor muscarínico M<sub>3</sub> tiene una estructura compuesta por 590 aminoácidos y un peso molecular de 66.127 daltons. Los estudios de unión de secretagogos a los receptores muscarínicos en células acinares pancreáticas se han realizado con antagonistas de los mismos marcados radiactivamente [N-metil-<sup>3</sup>H]escopolamina ([<sup>3</sup>H]NMS) o [<sup>3</sup>H]quincilidinil benzilato ([<sup>3</sup>H]QNB). Con el fin de determinar el número de receptores por célula acinar, se han realizado estudios en la rata empleando [<sup>3</sup>H]NMS. Estos

estudios indican la existencia de aproximadamente 24.000 receptores por célula (Dehaye y cols, 1984). Otros estudios realizados con [<sup>3</sup>H]QNB indican la existencia de entre 20.000 y 30.000 receptores por célula (Hootman y cols, 1985). En contraste, en el cobaya se ha descrito la existencia de sólo 2.650 receptores por célula (Murakami y cols, 1989).

El análisis de los resultados obtenidos con [<sup>3</sup>H]NMS o [<sup>3</sup>H]QNB sugiere un único sitio de unión para la mayoría de los antagonistas de los receptores; sin embargo, estudios realizados con carbacol demostraron que un modelo con un doble sitio de unión es el que mejor se adapta a los datos obtenidos. En acinos pancreáticos de rata, Dehaye y cols. (1984) indicaron que el porcentaje de sitios de unión de alta afinidad para el carbacol era el 14% del número total de receptores, siendo los lugares de unión de baja afinidad el 86% restante. Sin embargo otros estudios sugieren que los receptores de alta afinidad para el carbacol constituyen el 49-52% del total (Larose y cols, 1981; Asselin y cols, 1987). Por término medio, el número de receptores de baja afinidad supera de 4 a 6 veces el de los receptores de alta afinidad, mientras que para los receptores de la CCK la ratio es de 100 receptores de baja afinidad por cada receptor de alta (Yu y cols, 1990; Louie y Owyang, 1991).

En el páncreas de rata el agonista muscarínico más potente es la oxotremorina; otros agonistas son la muscarina, el carbacol y la pilocarpina. En cuanto a los antagonistas, el 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina metiodida (4-DAMP) tiene una alta afinidad por el receptor M<sub>3</sub>, comparable con la atropina o la escopolamina, en tanto que la pirenzepina y el AF-DX-116 presentan baja afinidad por el receptor M<sub>3</sub>. El hexahidrosiladifenidol y la S-fenglutarimida también son antagonistas útiles para distinguir el receptor M<sub>3</sub> (Waelbroeck y cols, 1987; Waelbroeck y cols., 1996).

Se ha comprobado que la ocupación de los receptores muscarínicos M<sub>3</sub> en células acinares pancreáticas produce una activación de la fosfolipasa C (PLC), que va seguida de un incremento en la hidrólisis de los inosítoles fosfato, en las concentraciones de calcio libre citosólico ( $[Ca^{2+}]_i$ ) y de GMP cíclico (GMPC) (ver la revisión de Jensen, 1994), estimula la captación de glucosa y la expresión de genes tempranos (c-fos, c-myc y c-jun) (Lu y Logsdon, 1992) y tras una serie de pasos, no bien conocidos todavía, produce un incremento de la secreción enzimática (Yu y cols, 1987). Por otro lado la activación de los receptores M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub> está más relacionada con la inhibición de la adenilato ciclasa (Gutkind y cols., 1991; Stephens y cols., 1993).

De forma similar a la CCK, la curva dosis-respuesta del carbacol para la secreción enzimática tiene una configuración bifásica, así como existe un estado de alta y baja afinidad del receptor. Bajas concentraciones de agonistas de los receptores muscarínicos inducen

oscilaciones en  $[Ca^{2+}]_i$  como también se ha demostrado para la CCK, la bombesina o la sustancia P (Petersen y cols, 1991). Se ha propuesto que el estado de alta afinidad del receptor podría ser el responsable de el efecto estimulante y que el efecto inhibitor se debería al estado de baja afinidad de dicho receptor (Larose y cols, 1981).

Estudios llevados a cabo sobre la hidrólisis de inosítoles fosfato y la inhibición de la adenilato ciclasa, confirman que los receptores colinérgicos muscarínicos M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>5</sub> activan la PLC y no presentan ningún efecto inhibitor en la actividad de la adenilato ciclasa. De hecho, elevan sustancialmente los niveles de AMP cíclico (AMPC), efecto este similar al observado para el receptor M<sub>1</sub> (Peralta y cols., 1988). Por el contrario, los receptores M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub> inhiben la actividad de la adenilato ciclasa y producen una muy ligera activación de la hidrólisis de inosítoles fosfato (Peralta y cols, 1988).

Numerosos estudios (Asselin y cols, 1987; Louie y cols, 1991; Murakami y cols, 1989) han demostrado que la incubación de células acinares pancreáticas de rata o cobaya con agonistas de los receptores muscarínicos causa una subsecuente desensibilización de la secreción enzimática pancreática provocada tanto por otros agonistas muscarínicos como por agonistas de otros tipos de receptores, tales como la CCK o la bombesina. Este efecto no se observa para el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el ionóforo del calcio A23187, la sustancia P, el 8-bromo AMPC (8-Br AMPC), o el éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Gardner JD y Jensen RT, 1993; Murakami y cols, 1989). No se ha llevado a cabo ningún estudio para saber si la desensibilización de los receptores muscarínicos M<sub>3</sub> o de la bombesina, provocada por el carbacol, es debida a la fosforilación del receptor. Sin embargo un estudio reciente sugiere que éste puede ser el caso del receptor de la CCK (CCK<sub>A</sub>) (Klueppelberg y cols, 1991).

### **1.2.1.2. RECEPTORES PARA LA COLECISTOCININA**

La colecistocinina es un factor hormonal con numerosos efectos en el tracto gastrointestinal, entre ellos la contracción de la vesícula biliar y la estimulación de la secreción pancreática exocrina (Marx y cols., 1987). Las células secretoras de CCK se encuentran en todos los vertebrados distribuidas a lo largo del intestino y extendidas por todo el sistema nervioso central y periférico (Dockray, 1979).

La CCK está presente en la circulación sistémica con distintas formas moleculares: CCK58, CCK39, CCK33, CCK8, CCK5, CCK4 y posiblemente CCK21 y CCK12, pudiendo o no estar sulfatado el aminoácido situado en posición 7, que es un residuo de tirosina (Marx y cols., 1987).

Su principal efecto en el páncreas exocrino consiste en la estimulación de la secreción enzimática (Grossman, 1977), a la vez que aumenta la síntesis de proteínas (Dagorn y cols., 1984) y potencia la secreción de bicarbonato (ver la revisión de Solomon, 1994). También se ha demostrado una acción estimulante de la fracción hidroelectrolítica de la secreción pancreática. Este último efecto depende de la especie; en el gato no se produce (Brown y cols., 1967), mientras que en el perro (Debas y Grossman, 1973), en el conejo (Murillo y López, 1971) y en el pollo (Salido y cols., 1986) provoca un aumento en el flujo, aunque menos marcado que el que se produce en la secreción de proteínas; en la rata (Sewell y Young, 1975) y en el ratón (Mangos y cols., 1973) el efecto estimulante de la secreción de fluido es mayor incluso que el de la secretina; el páncreas de cobaya se caracteriza por responder a la CCK con una abundante secreción de fluido rico en bicarbonato (Matsumoto y Kanno, 1984). Por otra parte la CCK podría potenciar el efecto de la secretina en el páncreas exocrino de cobaya (Gardner y Jackson, 1977; Alcón y cols., 1997), ratón (Burnham y cols., 1984) y rata (Lee, 1979), aunque otros autores no encuentran potenciación entre ambos secretagogos (Camello y Salido, 1993) para esta última especie.

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

Estudios farmacológicos realizados en distintos tejidos han demostrado que existen dos clases de receptores para la CCK (Jensen y cols., 1989). El primer tipo son los receptores CCK<sub>A</sub>, únicos descritos en el páncreas de rata, receptores que tienen una alta afinidad por la CCK y baja afinidad por la gastrina, y son los principales responsables de la estimulación de la secreción enzimática del páncreas y la contracción de la vesícula biliar (Jensen y cols., 1989). El segundo tipo es el receptor CCK<sub>B</sub> también identificado como el receptor de la gastrina (Yu y cols., 1987). Este receptor tiene la misma afinidad para la CCK que para la gastrina y se ha descrito en las células acinares pancreáticas de cobaya, perro y en la línea tumoral de células acinares de rata AR42J (Fourmy y cols., 1984; Yu y cols., 1987).

#### Receptor CCK<sub>A</sub>

Sankaran y cols. (1980) determinaron la existencia de dos estados de afinidad del receptor CCK<sub>A</sub>, uno de alta afinidad (Kd 64 pM) y otro de baja afinidad (Kd 21nM). Se ha demostrado la existencia de estados de alta afinidad del receptor en rata, ratón, cobaya, perro, conejo y hombre

(Robberecht y cols., 1978). En algunas especies (cobaya, perro y ternero) ambos estados del receptor, alta y baja afinidad, están presentes en las células acinares pancreáticas, pero al menos en el cobaya solo el estado de alta afinidad del receptor está involucrado en los procesos de secreción enzimática; la ocupación del estado de baja afinidad del receptor alteraría la función celular de diferentes formas todavía no bien definidas (Jensen, 1994).

Existen dos péptidos naturales relacionados estructuralmente con la CCK, la ceruleina y la gastrina. La gastrina se encuentra en el organismo en diferentes formas moleculares, todas ellas idénticas estructuralmente a la CCK en el pentapéptido carboxilo terminal (Huang y cols., 1989). La ceruleina es un decapeptido aislado inicialmente de la piel de *Hyla caerulea*, siendo tan potente como la CCK-8 (Anastasi y cols., 1968). Además de estos péptidos mencionados se han desarrollado una gran variedad de péptidos sintéticos con mayor o menor afinidad para unirse al receptor CCK<sub>A</sub>, de entre todos ellos el denominado CCK-(26-32) feniletil ester o CCK-JMV-180 ha sido el más ampliamente utilizado en el estudio del receptor CCK<sub>A</sub>, debido a que actúa en el ratón y la rata como un agonista parcial que no produce inhibición supramáxima y en el cobaya como un antagonista del receptor (Howard y cols., 1984).

Entre los antagonistas del receptor se encuentra la proglumida o derivados de nucleótidos cíclicos como el 3',5' monofosfato de dibutilil guanosina, pero el antagonista más ampliamente usado es el L-364,718, debido a su potencia y selectividad por el receptor CCK<sub>A</sub> frente al CCK<sub>B</sub> (Jensen y Gardner, 1991).

Cuando la CCK-8 se une a su receptor se produce la activación de PLC, que provoca la síntesis de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> y la movilización de calcio con la consiguiente activación de las cinasas dependientes de calmodulina y de la proteína cinasa C, y la subsecuente secreción enzimática (Jensen, 1994). La curva dosis-respuesta de la secreción enzimática presenta la particularidad de ser bifásica, es decir, la secreción aumenta a medida que se incrementa la concentración de CCK hasta que alcanza un determinado valor, a partir de la cual la secreción enzimática disminuye. Este fenómeno se conoce como inhibición supramáxima. Sin embargo, el agonista parcial de la CCK, JMV-180, no provoca inhibición supramáxima (Matozaki y cols., 1990). El agonista parcial de la CCK-8, CCK-JMV-180, que actúa en la rata como un agonista del estado de alta afinidad y antagonista del estado de baja afinidad del receptor CCK<sub>A</sub> (Tsunoda y Owyang, 1993) causa la misma secreción enzimática máxima que la CCK, sin presentar inhibición supramáxima. Asumiendo que existen dos estados de afinidad del receptor CCK<sub>A</sub> se ha propuesto la hipótesis de que el estado de alta afinidad del receptor es el responsable de la porción ascendente de la curva de secreción enzimática, mientras que el estado de baja afinidad

provocaría la inhibición supramáxima al ser activado por altas concentraciones de CCK (Pandol y Schoeffield-Payne, 1986).

El CCK-JMV-180, así como bajas concentraciones de CCK-8 causan oscilaciones de calcio; sin embargo el incremento en  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  provocado por este agonista es mínimo comparado con el causado por la CCK. Además se ha demostrado que el CCK-JMV-180 es capaz de movilizar calcio por una vía independiente del  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  y desde depósitos de calcio insensibles a la cafeína (Saluja y cols., 1992). Estos datos y otros sugieren que la ocupación del estado de alta afinidad del receptor de la CCK provoca oscilaciones de calcio, formación de diacilglicerol por hidrólisis de fosfatidilcolina y secreción enzimática con mínimos incrementos en los niveles de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . En contraste la ocupación del estado de baja afinidad del receptor causa incrementos en los niveles de  $\text{IP}_3(1,4,5)$ , un incremento inicial de los niveles de diacilglicerol y un amplio y transitorio incremento en la concentración de calcio citosólico (Matozaki y cols., 1990).

Estudios en los que se ha empleado  $\text{I}^{125}\text{-BH-CCK-8}$ , un agonista de la CCK-8 marcado radiactivamente, han demostrado que esta sustancia es rápidamente introducida en la célula, no estando muy claro aún el porqué del fenómeno de la rápida internalización del receptor (Wank y cols, 1988).

### Receptor $\text{CCK}_B$

Numerosos estudios han demostrado la presencia de receptores  $\text{CCK}_B$  en células acinares pancreáticas de cobaya, perro y la línea tumoral de células acinares de rata AR 42J (Yu y cols., 1987; Fourmy y cols., 1987). El receptor  $\text{CCK}_B$  presenta una alta afinidad por la gastrina, hasta el punto que se ha identificado igualmente como el receptor de la gastrina, por esta razón se denomina receptor  $\text{CCK}_B/\text{gastrina}$  (Jensen, 1994) y de este modo se le denominará a lo largo de esta Tesis.

La gastrina fue una de las primeras hormonas gastrointestinales que se descubrieron; está formada por 17 aminoácidos y tiene en común con la CCK el pentapéptido carboxilo terminal, así como los efectos en la secreción pancreática exocrina (Gardner y Jensen, 1987).

El antagonista del receptor  $\text{CCK}_A$ , L-364,718, que tiene una alta afinidad por dicho receptor, presenta, en cambio, muy baja afinidad por el receptor  $\text{CCK}_B/\text{gastrina}$ ; sin embargo, existe un antagonista selectivo para el receptor  $\text{CCK}_B/\text{gastrina}$ , el L-365,260. Este antagonista tiene una alta afinidad para el receptor  $\text{CCK}_B/\text{gastrina}$  ( $\text{K}_i$  7nM) (Jensen, 1994).



No se conoce con exactitud el papel fisiológico del receptor CCK<sub>B</sub>/gastrina en páncreas. En acinos pancreáticos de cobaya la ocupación del receptor CCK<sub>B</sub>/gastrina no estimula la secreción de enzimas ni incrementa la concentración de calcio citosólico (Yu y cols., 1987). En acinos pancreáticos de perro, la gastrina es aproximadamente 1000 veces menos potente que la CCK-8 estimulando la secreción enzimática. Estos resultados sugieren que no parece ser este su papel fisiológico en el páncreas exocrino (Jensen, 1994). En el caso particular de las células AR 42J, el receptor CCK<sub>B</sub>/gastrina está acoplado a múltiples proteínas G, de modo similar al receptor CCK<sub>A</sub> en células acinares pancreáticas normales de rata, y su activación provoca un ligero incremento en la secreción enzimática (Lambert y cols., 1991).

### **1.2.1.3. RECEPTOR DE LA BOMBESINA**

La bombesina es un tetradecapéptido originalmente aislado de la piel de la rana *Bombina bombina*. Este péptido es estructuralmente similar a dos péptidos existentes en los mamíferos, el péptido liberador de gastrina (GRP) y la neuromedina B (NMB), ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal.

En 1991 Battey y Wada describieron la existencia de dos tipos de receptores para la bombesina: el receptor del GRP (con una alta afinidad para el GRP y la bombesina pero con afinidad 30 veces menor para la NMB) y el receptor para la NMB (con una alta afinidad para la NMB, afinidad intermedia para la bombesina, pero 300 veces menor para el GRP). Recientes estudios han puesto de manifiesto la existencia de dos nuevos tipos de receptores para la bombesina el subtipo 3 o BRS-3 identificado por Fathi y cols. en 1993 en células testiculares y de carcinoma de pulmón y el subtipo 4 o BB4 identificado por Nagalla y cols. en 1995 en oocitos de *Xenopus*. El receptor BRS-3 no interacciona con alta afinidad con ninguno de los agonistas o antagonistas de la familia de receptores de la bombesina, lo que sugiere que el agonista natural de este receptor es un péptido aún no identificado de la familia de la bombesina o un péptido no relacionado (Mantey y cols., 1997). El receptor BB4 presenta mayor afinidad por la bombesina que por el GRP (Nagalla y cols., 1995).

Numerosos estudios (Hootman y cols, 1986; Susini y cols, 1986; Murakami y cols, 1989; Louie y Owyang, 1991) han demostrado la presencia de receptores del GRP de alta afinidad para la bombesina en células acinares pancreáticas en un elevado número de especies incluyendo rata, ratón, cobaya, cerdo y hombre, mientras que no hay ninguna evidencia de la presencia de estos receptores en células acinares pancreáticas de perro. Otros estudios farmacológicos han demostrado que los receptores de la bombesina encontrados en las células acinares pancreáticas son del tipo del GRP (Von Schrenck y cols, 1989).

La bombesina, así como cada uno de los péptidos relacionados, son capaces de activar los receptores del GRP localizados en los acinos pancreáticos de distintas especies, demostrándose que el grupo carboxilo terminal de estos péptidos es la porción biológicamente activa (Lin y cols, 1992). Por otro lado se han descrito seis clases diferentes de antagonistas de los receptores del GRP (Jensen y Coy, 1991). La primera clase es un análogo de la sustancia P, mientras que los otras clases de antagonistas son análogos de la bombesina.

Tras la unión de la bombesina (y péptidos relacionados) al receptor del GRP en células acinares pancreáticas se produce la activación de la PLC, incrementando los niveles de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , de calcio citosólico y de diacilglicerol; el resultado final es un aumento en la secreción de enzimas pancreáticas (Jensen, 1994). En células Swiss 3T3 se ha observado que la activación del receptor del GRP además de activar la PLC también incrementa la concentración de AMPcíclico, hecho que no se produce en células acinares pancreáticas de ratón, rata, cobaya o en células SCLC humanas (García y cols., 1997). En contraste con la CCK, la curva dosis-respuesta para la liberación de amilasas provocada por bombesina no es bifásica en el cobaya ni en la rata (Von Schrenck y cols, 1989), pero si en el ratón (Huang y cols, 1990). En el cobaya, la ocupación de aproximadamente el 54% de los receptores por la bombesina causa una progresiva estimulación de la secreción de amilasa, la ocupación del 75% del receptor causa un máximo incremento en los niveles de calcio citosólico y de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , en tanto que la ocupación del 25% restante no causa más cambios en el calcio citosólico que los ya existentes. De modo similar a la CCK, la bombesina, a concentraciones bajas (1-100pM), causa oscilaciones de calcio, mientras que causa un transitorio incremento de calcio sin oscilaciones a concentraciones superiores a 100pM (Matozaki y cols, 1991).

Algunos resultados obtenidos con células acinares pancreáticas y células 3T3 sugieren que la interacción de la bombesina con el receptor del GRP está regulada por proteínas que unen nucleótidos de guanina (Fischer y Schonbrunn, 1988). Así mismo se ha comprobado que el pretratamiento con la toxina del cólera o la toxina pertussis no altera la capacidad de los nucleótidos de guanina para disminuir la afinidad del receptor del GRP (Fischer y Schonbrunn, 1988), lo que demuestra que las proteínas G involucradas en este proceso no son sensibles a dichas toxinas. Estudios posteriores indicaron que el receptor del GRP interacciona con proteínas  $G_i$  y con proteínas que unen GTP de bajo peso molecular (21-22 kDa) (Profrock y cols, 1992).

Además de la regulación del receptor de la bombesina por proteínas que unen GTP, se ha descrito que la activación del propio receptor así como de otros receptores en las células acinares pancreáticas puede causar la desensibilización del receptor (Younes y cols, 1989).

#### **1.2.1.4. RECEPTOR DE LA SECRETINA**

La secretina es un péptido que presenta dos formas moleculares (27 y 30 aminoácidos). Inicialmente se aisló y caracterizó en segmentos proximales del intestino delgado del cerdo (Jorpes y Mutt, 1961).

Esta hormona intestinal está considerada como 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 (Case y Argent, 1989). En el organismo existen una serie de hormonas con estructura similar, las cuales se han incluido en lo que se denomina familia de la secretina, constituida por la propia secretina, el VIP, el glucagón, el polipéptido de pituitaria activador de la adenilato ciclasa (PACAP-27 y PACAP-38) y el péptido histidina-isoleucina (PHI) (Case y Argent, 1989).

Se han descrito receptores para la secretina en células acinares pancreáticas de distintas especies: rata, ratón, cobaya, perro, gato y hombre (Robberecht y cols., 1976; Christophe y cols., 1976; Jensen y cols., 1983). Todos los péptidos anteriormente mencionados pertenecientes a la familia de la secretina pueden interactuar con el receptor de la secretina si son usados a una concentración suficientemente alta, incrementando los niveles de AMPc y alterando la función celular a través de este receptor (Jensen, 1994).

Las alteraciones en la función celular tras la activación del receptor de la secretina difiere de unas especies a otras; así, la ocupación de este receptor en cobaya, perro y hombre produce la activación de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles celulares de AMPc y estimulando la actividad de la proteína cinasa A pero no la secreción enzimática (Bommelaer y cols., 1981; Susini y cols., 1986). En el caso de la rata (Bissonnette y cols, 1984), se han descrito hasta cuatro tipos de receptores: uno con afinidad alta para la secretina y baja para el VIP, otro con baja afinidad para la secretina y alta para el VIP, un tercer receptor con baja afinidad para ambos péptidos y un último tipo que solo se combina, con baja afinidad, con la secretina. Los dos primeros tipos producen respuesta de secreción de amilasas a través de un incremento en los niveles de AMPc, el tercero no produce ni incremento de AMPc ni secreción de amilasa, y el cuarto tipo produce secreción de amilasa pero no incremento de AMPc (Case, 1978).

De modo similar a como se ha descrito para la CCK, la secretina es capaz tanto de incrementar los niveles de AMPc, como de activar la PLC a diferentes concentraciones en acinos pancreáticos (Gardner y cols, 1983). Recientemente se ha comprobado que existe una interacción entre los efectos secretagogos de la secretina y la CCK; así, la estimulación con ambos péptidos del páncreas resulta en una potenciación de sus efectos en el cobaya, efecto que está mediado por mecanismos colinérgicos (Alcón y cols., 1997).

#### **1.2.1.5. RECEPTOR DEL PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)**

El VIP es un péptido de 28 aminoácidos presente en el intestino, páncreas, glándulas salivales y sistema nervioso central y periférico (Dockray, 1987). Además de su efecto vasodilatador periférico, en el páncreas produce una respuesta secretora tanto de la secreción fluida como de la enzimática (Gardner y Jensen, 1987).

En la rata, el receptor del VIP es un péptido de 459 aminoácidos y peso molecular aproximado de 52KDa (Ishihara y cols., 1992). Este receptor presenta alta afinidad por el VIP y el PACAP-27, sin embargo, tiene baja afinidad por la secretina (Ishihara y cols., 1992). Como se describió en el apartado de la secretina, existe una serie de péptidos relacionados con el VIP que pueden unirse con mayor o menor afinidad a su receptor dando como resultado la activación de la adenilato ciclasa (Robberecht y cols., 1976). Hasta la fecha se han descrito tres clases de antagonistas para el receptor del VIP; sin embargo, ninguno de ellos presenta una alta afinidad por el receptor (Robberecht y cols., 1976).

A diferencia de la CCK, los agentes colinérgicos, la bombesina y las taquicininas, la activación del receptor del VIP no ocasiona cambios en la biología celular a través de la activación de la PLC (Jensen, 1994).

#### **1.2.1.6. RECEPTORES PARA LAS TAQUICININAS**

Bajo el nombre de Taquicininas se agrupan una serie de péptidos relacionados con la sustancia P. El nombre se debe originalmente a su rápido efecto sobre el músculo liso en contraste con el efecto lento de las bradicininas (Erspamer y Melchiorri, 1973). Las taquicininas incluyen varios péptidos no presentes en mamíferos como la fisalemina, la eledoisina y la casinina (Erspamer y Melchiorri, 1973) y péptidos presentes en mamíferos como la sustancia P, la neurocinina A (también llamada sustancia K, neurocinina  $\alpha$  o neuromedina L) y la neurocinina B.

La sustancia P es un pequeño péptido de 11 aminoácidos (Leeman y Hammerchlag, 1967), ampliamente distribuido por todo el organismo, aunque las mayores concentraciones se encuentran en el sistema nervioso central (SNC) y tracto gastrointestinal, particularmente en duodeno y colon (Hokfelt y cols., 1977).

La acción de la sustancia P, y de los péptidos relacionados, en la secreción pancreática exocrina está mediada por la unión a tres tipos de receptores específicos. El receptor NK<sub>1</sub>, que presenta una alta afinidad por la sustancia P y menor para la neurocinina A y la B. El receptor NK<sub>2</sub>, es el mayor afinidad tiene por la neurocinina A y poca afinidad por la sustancia P. El

receptor NK<sub>3</sub>, que tiene alta afinidad por la neurocinina B y poca para la sustancia P (Receptor Nomenclature Supplement, 1991).

En el páncreas de cobaya y en la línea celular tumoral de rata AR 42J la sustancia P y los péptidos relacionados activan la PLC, incrementando la concentración citosólica de calcio y de GMPcíclico y provocando la secreción enzimática (May y cols., 1978). La curva dosis respuesta para la capacidad de la sustancia P de estimular la secreción enzimática es monofásica, similar a la observada para la bombesina, pero diferente de las curvas bifásicas observadas para la CCK o el carbacol (Krimms y Pandol, 1988).

### **1.2.1.7. RECEPTORES PARA LA HISTAMINA**

La histamina, 2-(4-imidazolil) etilamina, es una amina primaria aislada por Best y cols en 1927. Está considerada como una hormona de acción local o autacoide producto de la descarboxilación del aminoácido histidina. Entre otras funciones es un estimulante de la secreción ácida gástrica (Code, 1982), interviene en reacciones alérgicas, y tiene ciertos efectos estimulantes en el páncreas del perro (Tankel y cols., 1957), y el conejo (Liebow y Franklin, 1982); sin embargo es poco eficaz como secretagogo en la rata (Chariot y cols., 1979).

Se conocen tres tipos de receptores para la histamina, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>. La estimulación de los receptores H<sub>1</sub> va acompañada de la hidrólisis de fosfolípidos de inositol y subsecuentemente un aumento de la secreción pancreática exocrina, como se ha observado en el conejo (Pariente y cols, 1990) y el cobaya (Salido y cols., 1990). Por el contrario los receptores H<sub>2</sub>, cuya acción parece mediada por la activación de la adenilato ciclasa vía una proteína G<sub>s</sub>, con el consiguiente incremento en la concentración de AMP cíclico (Johnson, 1982), parecen tener un efecto antagónico al observado para los receptores H<sub>1</sub> (Pariente y cols, 1989). El receptor H<sub>3</sub> ha sido identificado como un receptor presináptico, que además de inhibir la liberación neuronal de histamina también puede inhibir la liberación de otros neurotransmisores, como la serotonina, en el sistema nervioso central (Schlicker y cols., 1988). Estudios posteriores han demostrado que los receptores H<sub>3</sub> también se localizan en otros modelos celulares en el tracto gastrointestinal (Lewin y cols., 1992). En el páncreas los receptores H<sub>3</sub> juegan un papel importante en la regulación de la secreción exocrina mediada por mecanismos nerviosos en el cobaya (Jennings y cols., 1996; Salido y cols., 1997).

El efecto estimulador de la histamina en la secreción pancreática exocrina lleva acompañado una ligera elevación de la concentración del ion calcio citosólico (Salido y cols., 1990), pero también parece claro que los efectos secretores de la histamina están mediados por

la vía del AMPc (Lajas y cols., 1995; Camello y cols., 1997). La elevación de la concentración de calcio citosólico parece debida a la activación de los receptores H<sub>1</sub>, mientras que la estimulación de los receptores H<sub>2</sub> está relacionada con la elevación de los niveles de AMPc (Cheret y cols., 1984). La histamina es capaz de incrementar la liberación de potasio de las células del páncreas de cobaya; dicho efecto es considerablemente inferior al observado para la ACh (Rosado y cols., 1996). La liberación de potasio estimulada por la histamina o la ACh en el páncreas de cobaya necesita un elevación de la concentración de calcio citosólica (Rosado y cols., 1997a; Rosado y cols., 1997b). Tapia y cols (1997) han demostrado que la histamina, en un rango de concentraciones comprendido entre 0,1μM y 1mM, incrementa la liberación de tripsinógeno en el páncreas de cobaya.

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

## **1.2.2. RECEPTORES SIN FUNCIÓN SECRETORA**

### **1.2.2.1. RECEPTORES PARA LA INSULINA**

Existe una gran controversia respecto al efecto de la insulina en 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 el mismo animal que la insulina potencia la acción de la CCK en la secreción de amilasa tanto *in vivo* como *in vitro*. Posteriormente, Singh, en 1985, observó que la insulina no afecta a la secreción basal de amilasas pero sí potencia la secreción estimulada por ACh en fragmentos pancreáticos del ratón. Recientemente, se ha comprobado que la insulina estimula debilmente la secreción de amilasas pero potencian claramente la secreción estimulada por ACh en acinos pancreáticos de rata (Juma y cols., en prensa).

Se ha demostrado la existencia de receptores para la insulina en células acinares pancreáticas de ratón, rata y cobaya (Okabayashi y cols., 1990). En la rata y el ratón se ha observado la existencia de dos estados de afinidad para el receptor de la insulina, un estado de alta afinidad del receptor y otro de baja afinidad (Sankaran y cols., 1981). Estudios recientes han demostrado que secretagogos como la CCK-8 o el carbacol pueden interaccionar con el receptor de la insulina disminuyendo la afinidad de este por la insulina (Jensen, 1994). En el caso de la CCK-8 Okabayashi y cols. (1990) han demostrado que el efecto se debe a la ocupación del receptor CCK<sub>A</sub>, ya que fue bloqueado por el antagonista específico de dicho receptor, L-364,718.

La ocupación del receptor de la insulina estimula la captación de glucosa, así como la síntesis proteica (Williams y cols., 1981). Como se expuso anteriormente, la insulina potencia la liberación de amilasas estimulada por CCK tanto *in vivo* como *in vitro* (Kanno y Saito 1976; Saito y cols., 1980). Estudios recientes han demostrado que la insulina interacciona con las mismas proteínas G que la CCK; no obstante, hasta el momento, la relación entre los efectos aditivos de la activación del receptor de la insulina y la CCK y la capacidad para interaccionar con las mismas proteínas G no está clara (Jensen, 1994). Estudios realizados por Juma y cols (en prensa) han sugerido que la insulina es capaz de movilizar calcio desde los depósitos intracelulares; la potenciación del efecto de la ACh se lleva a cabo por diferentes mediadores intracelulares, entre ellos el  $Ca^{2+}$ , el AMP cíclico o las tirosinas cinasas.

#### **1.2.2.2. RECEPTORES PARA LA SOMATOSTATINA**

Es un péptido que se encuentra presente en el SNC, y es producido por las células D del tracto gastrointestinal y de los islotes de Langerhans (Reichlin, 1983). Tiene distinto efecto en el páncreas exocrino según las especies: en el perro (Boden y cols., 1975) y el hombre (Hanssen y cols., 1977) la somatostatina inhibe competitivamente la acción de la secretina así como la secreción de fluido y bicarbonato, mientras en el gato y la rata no tiene efecto en la secreción de fluido (Erspamer y cols., 1974).

Numerosos estudios han demostrado la existencia de receptores para la somatostatina en acinos pancreáticos de cobaya y rata, así como en la línea celular AR 42J (Viguerie y cols., 1987; Viguerie y cols., 1988). Recientemente se han identificado dos subtipos de receptores de la somatostatina, SSTR 1 y SSTR 2, de 391 y 369 aminoácidos, respectivamente (Jensen, 1994).

La somatostatina es un potente inhibidor de la secreción enzimática *in vivo* (Singh y cols., 1988). En la mayoría de los estudios se ha demostrado que la somatostatina provoca una inhibición parcial de la capacidad del VIP y la secretina para activar la adenilato ciclasa en acinos pancreáticos de rata y cobaya. Este efecto podría estar mediado por la activación de una proteína G de membrana (Jensen y cols., 1989). Singh y cols, (1988) demostraron, en acinos aislados de cobaya, que la somatostatina inhibe la secreción de amilasa estimulada por VIP, pero no modifica el efecto de la CCK.

Wiley y Owyang (1987) han demostrado que la somatostatina tiene potentes efectos en la transmisión colinérgica. Estos hechos sugieren que el mecanismo inhibidor de la somatostatina está mediado por agentes nerviosos colinérgicos (Li y Owyang, 1992).

No se sabe con certeza cual es el papel fisiológico del receptor de la somatostatina en los acinos pancreáticos por sí mismos y si el efecto inhibitor se produce por vías nerviosas colinérgicas. Posiblemente la activación del crecimiento sea el principal papel fisiológico de la interacción directa con la célula acinar (Jensen, 1994).

#### **1.2.2.3. RECEPTORES PARA LAS ENDOTELINAS**

Las endotelinas son cadenas peptídicas de 21 aminoácidos que contienen dos puentes disulfuro en el extremo amino terminal, habiéndose descrito tres tipos de endotelinas, endotelina-1, endotelina-2 y endotelina-3 (Yanagisawa y cols., 1988). En la actualidad están descritos dos tipos de receptores para las endotelinas en células acinares pancreáticas: el receptor ET<sub>A</sub>, altamente afín para las endotelinas 1 y 2 y poco afín para la endotelina-3, y el receptor ET<sub>B</sub>, igualmente selectivo para los tres isopéptidos de la endotelina (Yanagisawa y Masaki, 1989).

Actualmente existe controversia acerca del papel de las endotelinas en las células acinares pancreáticas. Hildebrand y cols. (1993) han descrito que las endotelinas 1 y 3 no producen ninguna alteración en la secreción enzimática, ni incrementan la concentración de calcio citosólico o de AMP cíclico en células acinares pancreáticas de rata; sin embargo, Yule y cols. en 1992 observaron que la endotelina 1 no estimula la secreción enzimática, pero a dosis de 10-50nM causa oscilaciones de calcio.

Hasta el momento, el papel fisiológico de la activación del receptor de las endotelinas no está claro (Hildebrand y cols., 1993). De lo anteriormente expuesto podría deducirse que no presenta efectos en la regulación de la secreción pancreática. En otros tejidos, las endotelinas tienen potentes efectos mitogénicos y en el crecimiento tisular (Bobik y cols, 1990), no siendo descabellado suponer que este podría ser también su papel en las células acinares pancreáticas.

#### **1.2.2.4. RECEPTORES PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF)**

Diversos estudios han demostrado la existencia de receptores para el EGF en rata y ratón (Logsdon y Williams, 1983). En acinos pancreáticos de rata el receptor del EGF tiene una alta afinidad por el EGF y su unión no es inhibida ni por el factor de crecimiento nervioso ni por la insulina; sin embargo, es inhibida por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Korc y cols., 1983).

Mientras en condiciones agudas el EGF no presenta efecto en la síntesis proteica ni en la secreción enzimática (Korc y cols., 1983), su efecto a largo plazo resulta contradictorio. Así, en cultivos celulares de células acinares de ratón o en exposiciones relativamente largas al EGF



(superiores a 1 hora) se ha observado que es capaz de incrementar la secreción enzimática basal, potenciar la secreción enzimática estimulada por CCK e incrementar la incorporación de timidina tritiada en ADN (Logsdon y Williams, 1983). Sin embargo, en el páncreas de rata, la exposición al EGF durante varios días no tuvo ningún efecto estimulador en el crecimiento o la secreción pancreática, ni en la síntesis de ARN o ADN (Lajas y cols., 1996).

El receptor del EGF, al igual que el de otros factores de crecimiento, consta de un dominio extracelular, una única región transmembranal y un dominio intracelular con actividad tirosina cinasa. Se ha demostrado la existencia del receptor del EGF en la rata y el ratón (Jensen, 1994). En la rata, el receptor presenta una alta afinidad por el EGF ( $K_d$  4,9 nM). Tanto en la rata como en el ratón, la unión del EGF a su receptor fue inhibida por agentes que activan la PLC, pero no fue alterada por aquellos agentes que incrementan la concentración de AMPcíclico (Logsdon y Williams, 1984).

La ocupación del receptor del EGF causa la dimerización del receptor, su autofosforilación y la fosforilación en residuos de tirosina de un gran número de proteínas intracelulares, entre las que se encuentra la PLC $\gamma$  (Ulrich y Schlessinger, 1990). Existen evidencias de que la activación de la PLC $\gamma$  se produce a través de la proteína Gi (Piiper y cols., 1997). Recientes estudios han demostrado que el EGF interacciona con la misma proteína G que la CCK en acinos pancreáticos de rata, así como con al menos nueve tipos más de proteínas G (Profrock y cols., 1991). El EGF inhibe los incrementos en Ins(1,4,5)P $_3$  y calcio provocados por la CCK-8, lo cual sugiere que la activación del receptor del EGF puede inhibir los incrementos en la actividad del isotipo de la PLC ocasionados por la CCK (Profrock y cols., 1991)

#### ***1.2.2.5. RECEPTORES PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE LAS PLAQUETAS (PDGF)***

Si bien el PDGF no es un péptido que regule fisiológicamente la actividad del páncreas exocrino, su empleo frecuente para el estudio de las interacciones entre los factores de crecimiento y los neuropéptidos hacen necesaria su inclusión en este apartado

Es un péptido dimérico de 30 KDa que regula la proliferación celular, la quimiotaxis y la reorganización del citoesqueleto. La unión a su receptor de membrana estimula su dimerización y subsecuentemente su transfosforilación (Rankin y Rozengurt, 1994).

El receptor del PDGF tiene una estructura dimérica, compuesta por subunidades A y B (Malarkey y cols., 1995). Dicho receptor presenta un dominio extracelular con afinidad para el PDGF, un único dominio transmembranal y un dominio catalítico intracelular con actividad

tirosina cinasa. Cuando el PDGF se une al receptor se produce autofosforilación y dimerización del mismo (Fantl y cols., 1993). La autofosforilación del receptor del PDGF tiene lugar en un gran número de sitios localizados a lo largo del dominio intracelular, a diferencia del receptor del EGF que se fosforila únicamente en residuos de tirosina localizados en el extremo carboxilo terminal (Malarkey y cols., 1995). La fosforilación del receptor del PDGF promueve la interacción del mismo con numerosas proteínas, entre ellas la PLC $\gamma$ , fosfatasa de fosfotirosinas que contienen dominios SH<sub>2</sub>, la proteína activadora de GTPasas GAP, la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-cinasa) y las tirosinas cinasas de la familia Src (Malarkey y cols., 1995). El PDGF de un modo indirecto estimula la fosforilación de proteínas asociadas a las placas de adhesión focal como la p125<sup>FAK</sup> y la paxilina en restos de tirosina (Rankin y Rozengurt, 1994).

Se ha descrito la existencia del receptor del PDGF en células acinares pancreáticas normales humanas y en células acinares tumorales humanas procedentes de adenocarcinoma, en estas últimas, la expresión de este receptor es 7 veces superior a la de las células normales (Ebert y cols., 1995).

#### **1.2.2.6. RECEPTORES PARA LOS FACTORES DE CRECIMIENTO DE LOS FIBROBLASTOS (FGF)**

Los factores de crecimiento de los fibroblastos son una familia de factores de crecimiento que incluye al menos siete péptidos diferentes (Dionne y cols., 1991), de los cuales los más conocidos son el fragmento ácido y el fragmento básico. El fragmento básico del FGF (bFGF) es un polipéptido mitógeno que regula una gran variedad de funciones biológicas en distintos tejidos. El bFGF estimula la secreción de amilasas de forma dosis-dependiente (Chandrasekar y Korc, 1991).

El bFGF se une a receptores de membrana con actividad tirosina cinasa intrínseca (Coughlin y cols., 1988). Los receptores del FGF presentan un dominio extracelular que tiene homología con las inmunoglobulinas. Se han descrito 5 genes que codifican receptores del FGF (Dionne y cols., 1991), cada uno de estos receptores muestra especificidad selectiva para los distintos tipos de FGF.

La ocupación del receptor del FGF desencadena la activación de muchos de los sustratos descritos para el PDGF, entre ellos la PLC $\gamma$ , enzima que induce la hidrólisis de PI(4,5)P<sub>2</sub> generando DAG e Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Chandrasekar y Korc, 1991). Como veremos más adelante el DAG activa la proteína cinasa C, mientras que el Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> provoca la liberación de calcio

desde los depósitos intracelulares. Otra proteína que activa es la GAP (Podolsky, 1994). Al igual que otros factores de crecimiento, la ocupación del receptor del FGF inicia la expresión de proto-oncogenes como c-fos y c-myc (Podolsky, 1994).

El bFGF inhibe la unión del EGF a su receptor de membrana en acinos pancreáticos (Korc y cols., 1983). Estudios recientes (Lajas y cols., 1997) han mostrado que el bFGF puede inhibir la secreción de amilasas estimulada por la CCK al activar las rutas en las que estarían implicadas tirosinas cinasas, dado que dicha inhibición puede ser bloqueada por el uso de inhibidores específicos de las tirosinas cinasas como la tirfostina A25.

### ***1.3. MECANISMOS DE ACOPLAMIENTO ESTÍMULO RESPUESTA EN EL PANCREAS EXOCRINO.***

Los fenómenos que siguen a la ocupación del receptor, que median entre la presencia de una señal extracelular y la respuesta celular a esa señal, se conocen con el nombre de mecanismos de acoplamiento estímulo-respuesta. Este término fue utilizado inicialmente por Douglas en 1968 aplicado al papel del calcio en la secreción en diferentes células, pero ahora es utilizado en sentido general.

Los mecanismos de acoplamiento estímulo-respuesta pueden dividirse para su estudio en señales transmembranales y mensajeros intracelulares. Los mensajeros intracelulares incluyen sustancias tales como iones, nucleótidos cíclicos, proteínas cinasas, proteínas fosfatasas y fosfolípidos.

#### ***1.3.1. SEÑALES TRANSMEMBRANALES***

##### ***1.3.1.1. PROTEINAS G***

Las proteínas G, también conocidas como "GTP binding proteins", están compuestas por un número determinado de subunidades  $\alpha$  y un menor número de subunidades  $\beta$  y  $\delta$ . Las proteínas G que regulan la adenilato ciclasa se han clasificado como estimuladoras ( $G_s$ ) e inhibidoras ( $G_i$ ), basado en la presencia de distintas subunidades  $\alpha_s$  y  $\alpha_i$ , las cuales también pueden distinguirse en base a su sensibilidad a la toxina del cólera y la toxina pertussis (Simon y cols., 1991).

La subunidad  $\alpha$  posee un lugar de unión a nucleótidos de guanina, que inicialmente está ocupado por GDP; cuando se produce la unión del secretagogo al receptor, la proteína G se activa, consistiendo esta activación en la sustitución de la molécula de GDP por GTP, lo cual conlleva la separación de la subunidad  $\alpha$  de las otras dos, y esta subunidad activa a su efector

(fosfolipasa C o adenilato ciclasa). El GTP es hidrolizado a GDP debido a una actividad intrínseca GTPasa de la subunidad  $\alpha$  y de este modo dicha subunidad se inactiva y se une a las otras subunidades de nuevo (Yule y Williams, 1994).

Este sistema produce una amplificación de la señal debido a que la duración del complejo GTP-proteína G es mayor que la del complejo hormona-receptor. (Yule y Williams, 1994).

Simon y cols (1991) han demostrado la existencia de una gran diversidad de proteínas pertenecientes a la familia de proteínas G, las cuales se han clasificado en cuatro clases: la familia de proteínas  $G_s$ ; la familia de proteínas  $G_i$ , las cuales son muy abundantes en el cerebro; una nueva familia de proteínas G,  $G_q$ , ampliamente distribuidas y finalmente unas proteínas de 42 y 43KD que activan la PLC específica de fosfoinosítidos. Esta gran variabilidad sugiere que diferentes vías de acoplamiento estímulo-respuesta podrían llevar asociadas distintos tipos de proteínas G. Así mismo, receptores tales como el de la CCK, el cual existe en estados de alta y baja afinidad, posiblemente podría activar diferentes tipos de proteínas G en cada estado de afinidad (Yule y Williams, 1994).

#### **1.3.1.2. EFECTORES DE MEMBRANA (PLC, ADENILATO CICLASA)**

La adenilato ciclasa es la enzima que sintetiza AMPc y se ha encontrado en todos los tejidos de los mamíferos. Existen tres formas bioquímicamente diferentes, dos de ellas son proteínas de membrana: una sensible a la calmodulina y otra insensible a la calmodulina. El tercer tipo es una proteína soluble que sólo se ha encontrado en el testículo. La adenilato ciclasa pancreática no es estimulada por la calmodulina (Yule y Williams, 1994).

En contraste con la localización predominantemente membranal de la adenilato ciclasa, la PLC se ha identificado en el citosol de muchas células. El estudio de esta enzima ha revelado que existen al menos nueve isoformas de PLC que pueden ser categorizadas dentro de cuatro familias llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (Meldrum y cols, 1991). Todos los tipos de PLC tienen como sustratos a los fosfatidilinosítoles y sus derivados fosforilados, Ins(4)P y Ins(4,5)P<sub>2</sub>.

Los únicos estudios que se han llevado a cabo para identificar los tipos de PLC que existen en el páncreas fueron por inmunoblotting, los cuales mostraron la presencia en el páncreas de rata de los tipos  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (Rhee y cols., 1991). Actualmente hay evidencias de que la PLC- $\gamma$  es activada mediante una fosforilación de restos de tirosina tras la unión de factores de crecimiento (tales como el factor de crecimiento epidermal, EGF, y el factor de crecimiento de fibroblastos, FGF) a su receptor. La activación de la PLC- $\beta$  es la responsable de la hidrólisis de

Ins(4,5)P<sub>2</sub>, con la producción de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> y diacilglicerol, en respuesta a secretagogos (Yule y Williams, 1994).

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

### **1.3.2. MENSAJEROS INTRACELULARES**

#### **1.3.2.1. INOSITOL (1,4,5) TRIFOSFATO. (INS[1,4,5]P<sub>3</sub>)**

La estimulación de la PLC produce la hidrólisis de Ins(4,5)P<sub>2</sub> con la formación de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> y 1,2 diacilglicerol (DAG). Ambas moléculas actúan como mensajeros intracelulares primarios en el páncreas. La acción principal del Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> consiste en provocar una rápida liberación del ion calcio desde depósitos intracelulares no mitocondriales; esta función es específica para este isómero, el resto de los isómeros no provocan dicha liberación (Yule y Williams, 1994).

Los estudios muestran que la formación de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> es muy rápida. En acinos pancreáticos marcados con [<sup>3</sup>H]inositol y estimulados con dosis máximas de CCK o carbacol se ha observado un rápido incremento en los niveles de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, alcanzando el máximo a los 5 segundos (Rubin y cols., 1984).

Estudios realizados mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) han encontrado múltiples isómeros del inositol trifosfato, incluyendo Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> y el Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>. Estos mismos estudios demuestran que el Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> aumenta a un nivel 2 a 5 veces superior al basal 5 segundos tras el estímulo, posteriormente disminuye aunque los niveles permanecen elevados hasta 10 minutos. La formación de Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> presenta un patrón diferente; su aparición presenta un retraso de 15 a 40 segundos tras el Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, pero continúa aumentando en presencia del estímulo. Una pequeña proporción del Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> generado tras la estimulación por un secretagogo (inferior al 5%) es una forma cíclica, esta forma es 16 veces menos potente que el Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> no cíclico en el páncreas exocrino. Esta forma cíclica es producida de manera continua a lo largo de la estimulación por un agonista, debido a su carácter de sustrato difícilmente degradable, se va acumulando gradualmente en el interior celular; por lo

tanto, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  provocada por esta forma cíclica podría ser importante en la estimulación por agonistas durante largos periodos de tiempo (Yule y Williams, 1994)

Estudios realizados por Rowley y cols. (1990) demostraron que concentraciones máximas de CCK, bombesina o agonistas colinérgicos pueden estimular la síntesis de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ; sin embargo a concentraciones menores de secretagogos, a las cuales se pueden apreciar cambios en la secreción y en la concentración intracelular de ion calcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (por ejemplo 1-50 pM de CCK) existe una gran dificultad para apreciar cambios en el metabolismo de los inositoles fosfato. Esta dificultad para detectar estos cambios no se sabe si es realmente debido a la ausencia de metabolismo de los inositoles fosfato o a la falta de sensibilidad en los métodos de estudio (Matozaki y Williams, 1989).

Se ha demostrado que el metabolismo del  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  se lleva a cabo por dos rutas. La primera de ellas es iniciada por la fosfatidilinositol 3'-cinasa (PI3-cinasa) sensible a  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, que fosforila el  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  a  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  el cual puede de nuevo defosforilarse por una 5-monofosfatasa a  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ ; esta molécula puede de nuevo fosforilarse a  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  y posteriormente a  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  e  $\text{IP}_6$  o bien defosforilarse a  $\text{Ins}(1)\text{P}$  o  $\text{Ins}(3)\text{P}$  dependiendo de la fosfatasa inicial (Berridge e Irvine., 1989). En la ruta alternativa el  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  puede defosforilarse a  $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$  e  $\text{Ins}(4)\text{P}$ . No se ha encontrado ningún papel fisiológico para ninguno de estos inositoles fosfato, únicamente se sabe que los niveles de  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  incrementan rápidamente en acinos pancreáticos tras la estimulación por un agonista, siendo sostenido este incremento a lo largo de la estimulación (Trimble y cols., 1987). Recientemente se ha propuesto un papel fisiológico para el  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , dado que la célula debe gastar energía para su síntesis es lógico pensar que esta molécula no es un mero derivado del catabolismo del  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Así algunos autores (Hill y cols., 1988) han propuesto que puede promover la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o facilitar la comunicación de depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ ; sin embargo no hay evidencias claras que confirmen estas acciones en las células acinares pancreáticas.

### **1.3.2.2. 1,2 DIACILGLICEROL**

El 1,2 diacilglicerol (DAG) es el activador endógeno de la proteína cinasa C (PKC). En contraste con el  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , los niveles de DAG siguen aumentando en presencia del agonista durante muchos minutos. Puede detectarse un incremento inicial de los niveles de DAG cinco segundos después de la estimulación con el secretagogo a la concentración máxima del mismo; este incremento es concomitante con el incremento en los niveles de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  y de la misma

magnitud (Matozaki y Williams, 1989). Sin embargo a bajas concentraciones del agonista a las cuales no es detectable ninguna modificación en los niveles de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, este incremento inicial en los niveles de DAG tampoco es apreciable (Matozaki y Williams, 1989).

El DAG también puede sintetizarse por la hidrólisis de otros fosfolípidos de membrana como la fosfatidilcolina. Este proceso de síntesis es muy importante en una gran variedad de tipos celulares (Loffelholz, 1989).

El análogo parcial de la CCK, CCK-JMV-180, que no provoca incremento en los niveles de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, tampoco causa el incremento inicial en los niveles de DAG aunque si provoca la fase posterior de síntesis del mismo (Matozaki y Williams, 1989).

### **1.3.2.3. CALCIO INTRACELULAR**

En las células acinares pancreáticas en reposo la concentración intracelular de calcio libre es de 50-200 nM. Para mantener esta concentración de calcio intracelular, existen una gran variedad de bombas y sistemas en la membrana plasmática y en los orgánulos citoplasmáticos. Uno de los mecanismos más importantes para mantener la  $[Ca^{2+}]_i$  es una  $Ca^{2+}$ -ATPasa dependiente de  $Mg^{2+}$ , esta bomba es muy importante en la restitución de la  $[Ca^{2+}]_i$  a niveles basales tras un estímulo (Ansah y cols., 1984). Determinados microsomas también poseen mecanismos para captar  $Ca^{2+}$ , en ellos se ha descrito una  $Ca^{2+}$ -ATPasa similar a la localizada en el retículo endoplásmico. Estos orgánulos también participan en el mantenimiento de la baja  $[Ca^{2+}]_i$  (Mualen, 1989). Otro de los mecanismos que participan en el mantenimiento de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular es un intercambiador  $Ca^{2+}/H^+$  (Yule y Williams, 1994).

Estudios llevados a cabo en suspensiones acinares o en célula aislada han puesto de manifiesto que concentraciones máximas de CCK, bombesina o agonistas colinérgicos provocan un rápido incremento en los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  de 5 a 12 veces superior a los niveles basales, pudiendo alcanzar una concentración máxima de 1  $\mu$ M (Ogami y cols., 1989). Este pico inicial disminuye paulatinamente hasta alcanzar en un periodo de 2 a 5 minutos un plato de aproximadamente dos veces el nivel basal, que se mantiene mientras el agonista esta presente. Cuando este estudio se lleva a cabo en un medio libre de calcio extracelular se observa que el incremento inicial es independiente de la presencia de calcio en el medio extracelular, sin embargo, el plato posterior en esta condiciones no es apreciable, indicando una absoluta dependencia de esta fase de la respuesta al calcio extracelular (Stuenkel y cols., 1989).

Posiblemente el incremento inicial en  $[Ca^{2+}]_i$  tras la estimulación con un agonista es mediada por el Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Yule y Williams, 1994).

Los estudios iniciales sobre los cambios provocados por un agonista en el contenido de  $Ca^{2+}$  de los orgánulos demostraron que el  $Ca^{2+}$  era liberado desde el retículo endoplásmico, sin apreciarse cambios significativos en otros orgánulos como la mitocondria o los gránulos secretores (Dormer y Williams, 1981). Posteriormente se ha planteado la hipótesis de la existencia de un orgánulo especializado en almacenar calcio denominado calciosoma (Volpe y cols, 1988). Recientemente se ha descrito que el Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> y la ADP ribosa cíclica producen liberación de  $Ca^{2+}$  desde los gránulos de zimógeno, por lo que estos gránulos también actuarían como almacenes intracelulares de calcio (Gerasimenko y cols., 1996)

Algunos autores han indicado que el Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> aparentemente solo es capaz de liberar una porción del  $Ca^{2+}$  almacenado, así pues esta molécula no sería el único mediador de la liberación de  $Ca^{2+}$  (Thevenod y cols, 1989).

Aunque se ha estudiado durante mucho tiempo los mecanismos que provocan la salida de calcio de los orgánulos citoplasmáticos y el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$ , los mecanismos que introducen calcio en el interior celular (influx de  $Ca^{2+}$ ) no están tan bien estudiados. Se sabe que la estimulación por un agonista provoca la entrada de  $Ca^{2+}$  en el interior celular, también se conoce que el influx no depende de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes del voltage, tampoco es sensible al potencial de membrana ni a bloqueantes orgánicos convencionales de los canales de  $Ca^{2+}$  como el verapamil; sin embargo es sensible al pH externo: así es favorecida por pH alcalino e inhibida en condiciones externas de acidez (Tsunoda y cols., 1990).

Actualmente no hay consenso en cuanto a los mecanismos relacionados con el influx de  $Ca^{2+}$ , no obstante parece claro que está relacionado con el relleno de los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$ , el llamado modelo capacitativo para el influx de  $Ca^{2+}$  (Yule y Williams, 1994).

A bajas concentraciones de CCK, bombesina o ACh el patrón de respuesta celular es diferente al observado con dosis máximas de estos agonistas, la respuesta se caracteriza por la aparición de oscilaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Yule y cols., 1991). Este fenómeno ha sido observado en células aislada de ratón, cobaya y rata. Estas oscilaciones son primariamente el resultado de liberaciones pulsátiles de  $Ca^{2+}$  desde almacenes intracelulares seguidas de una recaptación



subsecuente dependiente de ATP (Tsunoda y cols., 1990). Estas oscilaciones pueden iniciarse en ausencia de calcio extracelular; sin embargo el calcio extracelular es necesario para mantenerlas. Las oscilaciones pueden ser inhibidas por aquellos agentes que depleccionan el ATP celular (Tsunoda y cols., 1990). Concentraciones fisiológicas de agonista (3-50 pM de CCK o 50-300 nM de ACh) inducen, tras una latencia de 1 o 2 minutos, oscilaciones que continúan con una frecuencia relativamente constante de entre 1 y 4 ciclos por minuto durante el tiempo que el agonista esté presente. Por lo general la amplitud de las oscilaciones está relacionada con la concentración del agonista empleado (Yule y cols., 1991).

Se han propuesto muchos modelos para tratar de explicar mecánicamente la generación de estas oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Parece que todos los autores coinciden en la necesidad de la formación de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vía proteína G para explicar el incremento inicial en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; sin embargo no son necesarias oscilaciones de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  para generar oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wakui y cols., 1989). Otro hecho observado es que a concentraciones de agonista que provocan oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  no se observa ningún cambio en el metabolismo de los inositoles fosfato. Además, el análogo de la CCK, CCK-JMV-180 (JMV-180), que no provoca incremento en los niveles de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  si es capaz de provocar oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . El inhibidor de la PLC, U-73122, no inhibe las oscilaciones causadas por el JMV-180 aunque si inhibe las provocadas por CCK o carbacol (Yule y Williams, 1992). Consecuentemente, estos hallazgos ponen de manifiesto que otro segundo mensajero diferente del  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  podría actuar como una señal para provocar las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en células acinares pancreáticas (Saluja y cols., 1992). Así mismo posiblemente las oscilaciones provocadas por CCK y CCh son debidas a pequeños incrementos en los niveles de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , mientras que las oscilaciones generadas por el JMV-180 parecen provocadas a través de una vía distinta a la anteriormente descrita (Yule y Williams, 1994).

Existen evidencias de una proteína en el páncreas exocrino que es capaz de unir  $\text{Ca}^{2+}$ , dicha proteína mediaría la inhibición, inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (Zhou y Muallen, 1990). En el páncreas exocrino se ha observado que la interacción con la vía del AMPc no modula las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . El VIP, que es sabido incrementa los niveles de AMPc, no afecta ni a la generación ni al mantenimiento de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tsunoda y cols., 1990). Uno de los mecanismos propuestos para explicar las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se basa en la existencia de depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles e insensibles al  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Dicho segundo mensajero provocaría la liberación de una cantidad relativamente

pequeña de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos sensibles y las oscilaciones se propagarían por un proceso de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) desde depósitos insensibles al  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (Yule y Williams, 1994).

Se ha especulado mucho acerca del papel fisiológico de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se sabe que estas ocurren a bajas concentraciones fisiológicas de los agonistas y que el agonista de la CCK, JMV-180, es capaz de estimular la secreción de amilasas unicamente provocando oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por todas estas razones parece que estas oscilaciones juegan un papel importante en el control de la secreción de enzimas y fluidos en el páncreas exocrino (Yule y Williams, 1994).

Estudios sobre los aspectos espaciales de esta señal de  $\text{Ca}^{2+}$  han mostrado que la señal inicial es detectada en el polo luminal de la célula y posteriormente se propaga en forma de onda hacia la región basal de la célula (Toescu y cols, 1992). El significado de este hecho no está muy claro, pero podría indicar la localización de los depósitos primarios de  $\text{Ca}^{2+}$ . Recientemente se está estudiando mediante imagen digital la propagación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de las comunicaciones celulares en los acinos. Parece que durante las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  no todas las células del acino oscilan al unísono, y que cada ciclo oscilatorio que se origina en un área concreta del acino se extiende asincrónicamente hacia las células adyacentes (Yule y Williams, 1994).

Uno de los fenómenos estudiados recientemente ha sido la relación entre el incremento en la concentración de calcio citosólico y el pH intracelular. González y cols (1997a; 1997b) han demostrado que la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares, observado tras la estimulación con CCK, está acompañada por una disminución en el pH intracelular. Este fenómeno estaría mediado principalmente por la activación de un intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  localizado en la membrana plasmática.

#### **1.3.2.4. PAPEL DEL AMP CICLICO**

Del mismo modo que el ion calcio, el AMPc juega un papel muy importante en la modulación de la actividad secretora del páncreas exocrino. Polipéptidos de la familia de la secretina, el VIP y el glucagón incrementan la secreción pancreática exocrina a través de la modulación de los niveles de AMPc (para revisión ver Hootman y Williams, 1989). Más recientemente se ha podido comprobar que otras moléculas que actúan como reguladores endógenos incrementan los niveles de AMPc, el PHI (Jensen y cols., 1981), el rhGRF, y el

PACAP (Raufman y cols., 1991), así mismo se ha observado que autacoides como la histamina también pueden estimular la síntesis de AMPc (Lajas y cols., 1995).

La CCK a altas concentraciones también puede activar la adenilato ciclasa pancreática, pero este efecto no se cree que esté relacionado con un papel fisiológico (Zajic y Schacht, 1983).

Aquellos compuestos que, o bien estimulan la adenilato ciclasa, tales como la toxina del cólera o la forskolina, o inhiben la actividad de la fosfodiesterasa, que cataboliza el AMPc, como el 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), la teofilina y el Ro 20-174, afectan al metabolismo del AMPc (Korman y cols., 1990).

Inicialmente en el cobaya y posteriormente en la rata y el ratón se ha podido comprobar que los secretagogos que actúan incrementando los niveles de calcio intracelular y los que lo hacen aumentando el AMPc pueden potenciar sus efectos, sin embargo esta potenciación no afecta a todas las respuestas celulares, está muy bien establecida para la secreción enzimática, sin embargo no ocurre así para el transporte de  $\text{Na}^+$ , donde el efecto es aditivo, ni para el transporte de glucosa donde el efecto estimulador ocasionado por agentes que actúan incrementando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no se ve modificado por adición de VIP (Burnham y cols., 1984).

#### **1.3.2.5. PROTEINA CINASA C (PKC)**

La proteína cinasa C (PKC) es una enzima ubicua de la que se han descrito al menos once subtipos, entre ellos se encuentran: las isoformas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  o comúnmente llamadas convencionales ( $\text{PKC}\alpha$ ,  $\beta\text{I}$ ,  $\beta\text{II}$  y  $\gamma$ ); las isoformas independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  o "nuevas isoformas" ( $\text{PKC}\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ) y las "isoformas atípicas" ( $\text{PKC}\zeta$ ,  $\tau$  y  $\lambda$ ) y finalmente la  $\text{PKC}\mu$  que presenta homología con las isoformas "atípicas" y con las "nuevas" (para revisión ver Jaken, 1996). Las isoformas de la PKC identificadas por inmunobloting en células acinares pancreáticas de rata son  $\text{PKC}\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Pollo y cols., 1994).

La PKC fue inicialmente identificada como una cinasa dependiente de fosfolípidos y  $\text{Ca}^{2+}$  activada por el DAG (Nishizuka, 1984). Únicamente a muy altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se pueden activar las isoformas de la PKC dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ ; sin embargo esta alta concentración es enormemente disminuida en presencia de DAG. Así pues, el  $\text{Ca}^{2+}$  y el DAG pueden actuar sinérgicamente activando estas isoformas de la PKC (Bruzzone, 1990). Los ésteres de forbol, como el TPA, tienen una estructura similar al DAG y pueden activar la PKC en presencia de solo 100nM de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ashendel, 1985).

La proteína cinasa C está ampliamente distribuida en muchos tejidos y fosforila una amplia variedad de sustratos en residuos de serina y treonina. La actividad de la PKC está presente en células acinares pancreáticas y cuando es activada fosforila tanto proteínas endógenas como exógenas (Wrenn, 1983). La actividad de la PKC también se ha observado en asociación con las membranas de los gránulos de zimógeno (Wrenn, 1984). Se ha identificado una de las proteínas sustrato de la PKC, dicha proteína se ha denominado "MARCKS" (Jensen, 1994).

La prolongada incubación de las células acinares pancreáticas con TPA produce una deplección de la PKC, esto es conocido como "down regulation". Este fenómeno en el cobaya se ha observado que disminuye la magnitud y la sensibilidad de la secreción enzimática en dichas células a la CCK y al carbacol, sin afectar a la respuesta al ionóforo del calcio ni al VIP (Sung y cols., 1988).

El inhibidor de la PKC, estaurosporina, es el inhibidor más potente descrito en la literatura, sin embargo tiene baja selectividad por la PKC, uniéndose también a otras proteínas cinasas (Toullec y cols., 1991). el GF109203X, es un inhibidor de la PKC sintetizado posteriormente que presenta una potencia similar pero una mayor selectividad que la estaurosporina (Toullec y cols., 1991)

#### **1.3.2.6. PROTEINAS CINASAS ACTIVADAS POR NUCLEOTIDOS CICLICOS**

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

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

Estudios recientes han demostrado que tanto la secretina como el VIP, son capaces de activar la proteína cinasa activada por el AMPc, con una muy buena correlación de dicha activación con los incrementos en los niveles de AMPc (Jensen y Gardner, 1978). Sin embargo se ha demostrado que concentraciones fisiológicas de CCK no incrementan la actividad de dicha cinasa; únicamente a concentraciones supramáximas se ha observado que la CCK puede activar esta cinasa, relacionado con el incremento en los niveles de AMPc observados a estas concentraciones, y a las que no se ha encontrado una significación fisiológica (Willems y cols., 1987).

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

Los sustratos de la proteína cinasa activada por AMPc son totalmente desconocidos, pero todavía menos se conoce acerca de la proteína cinasa activada por GMPc que se ha descrito en células acinares (Van Leemput-Coutrez y cols., 1973; Yule y Williams, 1994).

### ***1.3.2.7. PROTEINAS CINASAS Y FOSFATASAS ACTIVADAS POR ION CALCIO-CALMODULINA***

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

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

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

Se han identificado cuatro de estas proteínas en el páncreas: la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) (Bissonette y cols, 1989), CaM cinasa I (Nairn y cols, 1985), CaM cinasa II (Gorelick y cols, 1983) y la CaM cinasa III (Nairn y cols, 1985). La CaM cinasa I fue inicialmente aislada por su capacidad para fosforilar una proteína de las vesículas sinápticas, la sinapsina I. La CaM cinasa II fue aislada a principios de los 80; la forma pancreática consiste en una única subunidad de 50 KDa (Gorelick y cols, 1983), presenta una reacción inicial de fosforilación intramolecular previa a la fosforilación de sustratos exogenos que aún no han sido identificados. Estudios recientes han demostrado que la proteína fosfatasa 1 participa en la defosforilación de la CaM cinasa II, oponiéndose a la teoría que sugería que esta proteína presentaba actividad autónoma (Hwang y cols., 1996). La CaM cinasa III, de 140 KDa, se sabe que es relativamente específica para su sustrato, el factor 2 de elongación, una proteína de 100

KDa que está relacionada con la traslación ribosomal de ARNm (Nairn y Palfrey, 1987); cuando este factor es fosforilado la eficiencia de la traslación disminuye significativamente. El papel fisiológico de esta proteína podría estar relacionado con el efecto de las altas concentraciones de CCK para inhibir la síntesis de proteínas (Yule y Williams, 1994). La MLCK es una proteína de 138 KDa cuya actividad se cree responsable de la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina observada en acinos pancreáticos estimulados por CCK (Burnham y cols, 1988).

#### **1.3.2.8. PROTEINA FOSFATIDILINOSITOL 3'-CINASA**

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

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

Recientemente se ha descrito una proteína que puede actuar como el segundo mensajero para la PI3 cinasa, una proteína serina-treonina cinasa de 60 KDa que se ha denominado Akt/PKB (Bos, 1995). El dominio carboxilo terminal de esta proteína es una cinasa relacionada con la proteína cinasa A y con la proteína cinasa C, mientras que el dominio amino terminal es un dominio con homología pleckstrina, este dominio es una secuencia de unos 100 aminoácidos identificado inicialmente en la proteína que le da el nombre, y que posteriormente se ha identificado en otras 70 proteínas más, entre las que se encuentran serina/treoninas y tirosinas cinasas, distintas isoformas de la PLC, GTPasas, factores intercambiadores de nucleótidos y componentes del citoesqueleto (Mayer y cols., 1993). El dominio PH está relacionado tanto con la relación proteína-proteína como la interacción proteína-lípido (Bos, 1995).

No se sabe mucho acerca de los posibles sustratos de la Akt/PKB. Hasta la fecha sabemos que cuando dicha proteína esta inactiva se encuentra en forma dimérica, tras la llegada de un estímulo el fosfatidilinositol 3 fosfato induce el paso a la forma monomérica, es en esta forma en la que la Akt/PKB puede ser fosforilada y activada (Bos, 1995). Un posible sustrato de la Akt/PKB es la proteína p70<sup>s6k</sup> cinasa, si bien no se sabe con exatitud si la Akt/PKB fosforila directamente a dicha cinasa (Bos, 1995), si está bien descrito que la PI3-cinasa participa como

regulador en la activación de la p70<sup>S6k</sup> por la CCK-8 en células acinares pancreáticas (Bragado y cols., 1997).

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

#### **1.3.2.9. PROTEINAS FOSFATASAS**

En la regulación del estado de fosforilación de las proteínas intracelulares, también juegan un papel muy importante las fosfatasas, ya que dicho estado de fosforilación viene dado por el balance entre la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas (Cohen y Cohen, 1989).

Se han identificado, hasta nuestros días, cuatro tipos diferentes de proteínas fosfatasas específicas para residuos de serina / treonina en células eucariotas (Cohen y Cohen, 1989): tipos 1, 2A, 2B y 2C. El tipo 1 está modulado por dos proteínas reguladoras denominadas inhibidor-1 e inhibidor-2. El tipo 2 se encuentra dividido en 2A, 2B y 2C; el subtipo 2A es dependiente de Ca<sup>2+</sup>, El subtipo 2B es dependiente de Mg<sup>2+</sup> mientras que el subtipo 2C es independiente de los cationes divalentes (Bialojan y Takai, 1988). Como se mencionó anteriormente la proteína fosfatasa 1, está implicada en la defosforilación de la CaM cinasa II (Hwang y cols., 1996).

El ácido okadaico es un potente inhibidor de los tipos 2A y 1, mientras que es un debil inhibidor del tipo 2B y no afecta al tipo 2C (Bialojan y Takai, 1988). Este inhibidor a concentración micromolar es capaz de inhibir la secreción de amilasas estimulada por CCK, carbacol y bombesina en acinos pancreáticos de rata (Wagner y cols, 1992a). Otro inhibidor es la caliculina A, que se ha revelado como un inhibidor más potente que el ácido okadaico en la secreción pancreática, sugiriendo que el efecto inhibidor va dirigido al tipo 1 (Wagner y cols, 1992a).

En el páncreas de la rata se han identificado ambos tipos de proteínas fosfatasas, 1 y 2, basandose en la defosforilación de la fosforilasa cinasa (Burnham, 1985). También se ha

purificado en el páncreas una fosfatasa activada por  $\text{Ca}^{2+}$ ; esta fosfatasa está compuesta por dos subunidades y puede ser activada por calmodulina (Burnham, 1985) de forma similar a la fosfatasa 2B localizada en el cerebro y denominada calcineurina.

### **1.3.2.10. OTROS MENSAJEROS INTRACELULARES**

Otro posible mensajero intracelular es el guanosin monofosfato cíclico (GMPc), cuyos niveles intracelulares son incrementados por la CCK, la ACh y el ionóforo del calcio A23187 (Kapoor y Krishna, 1978). Aunque el papel del GMPc en la secreción pancreática exocrina no está claro todavía, recientemente se ha sugerido que podría mediar el influx de calcio. (Pandol y Schoeffield-Payne, 1990).

Determinados secretagogos pancreáticos, tales como la CCK o el carbacol, son capaces de incrementar los niveles de ácido araquidónico en las células acinares (Halenda y Rubin, 1982). El ácido araquidónico es sintetizado por la acción secuencial de la PLC y la DAG lipasa sobre los inositoles fosfato. A concentraciones altas de secretagogos también es activada otra fosfolipasa, la fosfolipasa  $A_2$ , que hidroliza fosfatidilcolina e inositoles fosfato, sintetizando ácido araquidónico (Halenda y Rubin, 1982). Estudios posteriores llevados a cabo por Hou y cols (1996) han demostrado que la ceruleína estimula la producción de ácido araquidónico en acinos pancreáticos de rata a través de la PLC y la DAG lipasa, sin intervención de la  $PLA_2$  o la PLD.

El ácido araquidónico presenta un efecto inhibitor de la secreción enzimática, efecto este que parece ser debido a una disminución de los niveles de  $PI(4,5)P_2$  y de la producción de  $Ins(1,4,5)P_3$  inducida por secretagogos. Además el ácido araquidónico causa una deplección en la concentración de ATP (Chaudhry y cols., 1988).

Las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa son las encargadas de degradar el ácido araquidónico a prostaglandinas y leucotrienos (Stenson y Lobos, 1982), de los que existen evidencias de su participación como mensajeros intracelulares en los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción en las células acinares pancreáticas (Yule y Williams, 1994).

Existen otras múltiples rutas intracelulares de acoplamiento estímulo respuesta descritas en el páncreas exocrino, entre ellas se encuentran la ruta de las GTPasas de bajo peso molecular de la familia Ras, que juegan un papel muy importante en el crecimiento y la transformación celular (Malarkey y cols., 1995); las GTPasas de bajo peso molecular de la familia Rho, que serán estudiadas en profundidad en el capítulo IV; la ruta de las MAP cinasas, las cuales juegan un importante papel en el crecimiento y la proliferación celular estimulada por factores de



crecimiento, agonistas que activan las proteínas G de membrana, citoquinas y determinados antígenos (Malarkey y cols., 1995). Tras la activación, las MAP cinasas se translocan hacia el núcleo celular e inician la activación de protooncogenes tales como c-jun (Pulverer y cols., 1991). Otros mecanismos celulares activados por las MAP cinasas incluyen la fosforilación de la proteína p90 ribosomal S6 cinasa (p90<sup>S6k</sup>), la PLA citosólica, la proteína activada por las MAP cinasas (MAPKAP) y la estimulación del transporte de glucosa (Blenis, 1993; Malarkey y cols., 1995).

Otra ruta de importancia relevante en los mecanismos de acoplamiento estímulo-respuesta del páncreas son las proteínas tirosinas cinasas. Entre los agentes inicialmente relacionados con la actividad tirosina cinasa están la insulina y los factores de crecimiento como el EGF y el FGF (Carpenter, 1987). Este mecanismo es uno de los acontecimientos que preceden a los procesos de división y proliferación celular. Posteriormente se demostró que hormonas con efectos tróficos, como la CCK, activan la actividad tirosina cinasa (Lutz y cols., 1993). Recientemente se ha demostrado que las tirosinas cinasas también están implicadas en la acción secretagoga de determinadas sustancias, entre las que se encuentra la CCK (Duan y cols., 1994). Esta vía será estudiada en profundidad en el tema III.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA GENERAL

## 2.1. LISTA DE REACTIVOS

- A-23187: Ionóforo del calcio. Sigma Chemical Corporation<sup>®</sup>.
- Ácido plurónico: ácido plurónico F127. Molecular Probes Inc<sup>®</sup>.
- Acrilamida: Bio-Rad<sup>®</sup>.
- Anticuerpo anti-fosfotirosina PY20: anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina PY20. Transduction laboratories<sup>®</sup>.
- Anticuerpo anti-FAK mAb: anticuerpo monoclonal anti-p125<sup>FAK</sup>. Transduction laboratories<sup>®</sup>.
- Anticuerpo anti-paxilina mAb: anticuerpo monoclonal anti-paxilina. Transduction laboratories<sup>®</sup>.
- Anticuerpo anti Ig G de ratón: anticuerpo de conejo anti Ig G de ratón (H+L), no conjugado. Pierce<sup>®</sup>.
- Anticuerpo anti-mouse: anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa de rábano. Transduction laboratories<sup>®</sup>.
- Aprotinina: Boehringer Mannheim<sup>®</sup>.
- APS: persulfato amónico. Bio-Rad<sup>®</sup>.
- Azida sódica: Sigma Chemical Corporation<sup>®</sup>.
- Bisacrilamida: N,N'-metil-bis-acrilamida. Bio-rad<sup>®</sup>.
- BME aminoácidos: Basal Medium Eagle solución de aminoácidos (x 100). Sigma Chemical Corporation<sup>®</sup>.
- BME vitaminas: Basal Medium Eagle solución de vitaminas (x 100). Sigma Chemical Corporation<sup>®</sup>.
- Bromofenol blue: Bio-Rad<sup>®</sup>.
- BSA: Albúmina sérica bovina. Fracción V. Sigma Chemical Corporation<sup>®</sup>.
- Carbacol: cloruro de carbamilcolina. Sigma Chemical Corporation<sup>®</sup>.
- CCK-8: Colecistocinina octapéptido (CCK 26-33). Peninsula Laboratories, Inc<sup>®</sup>.
- Citocalasina D: citocalasina D de *Zygosporium mansonii*. Calbiochem<sup>®</sup>.
- Colagenasa CLSPA: Worthington Biochemical Corporation<sup>®</sup>.
- Colchicina: colchicina de *Colchicum autumnale*. Calbiochem<sup>®</sup>.
- Deoxicolato: ácido deoxicólico (ácido 5 $\beta$ -colan-24-oico-3, 12 diol). Sigma Chemical Corporation<sup>®</sup>.
- Digitonina: Sigma Chemical Corporation<sup>®</sup>.
- DMSO: Dimetilsulfóxido. Merck-Schuchardt<sup>®</sup>.
- DTT: Ditiotreitól. Bio-Rad<sup>®</sup>.

- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. Sigma Chemical Corporation®.
- EGTA: ácido etilenglicol-bis (b-aminoetiléter) N, N, N', N-tetraacético. Sigma Chemical Corporation®.
- Exoenzima C3: exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*. List Biological Laboratories Inc®.
- Fumarato sódico: ácido fumárico sal disódica anhidra. Fluka®.
- Fura-2AM: fura-2 acetoximetil éster (cell permeant) Molecular Probes Inc® , Sigma Chemical Corporation®.
- Genisteína: (4,5,7-Trihidroxiisoflavona) Sigma Chemical Corporation®.
- GF109203X: Biomol®.
- Glicina: Sigma Chemical Corporation®.
- Glutamato sódico: ácido L-glutámico sal monosódica. Fluka®.
- Glutamina: L-glutamina. Sigma Chemical Corporation®.
- Hepes:(ácido N-[Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]). Sigma Chemical Corporation®.
- JMV 180: Boc-Tyr (SO<sub>3</sub>H)-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-2-feniletiléster.2 NH<sub>3</sub>. Research Plus Inc®.
- L-364,718: Suministrado por los Drs. Paul Anderson y Ben Evans de Merck, Sharp y Dohme (West Point, P.A.).
- Leupeptina: N-acetil-leu-leu-arginal.1/2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Boehringer Mannheim Biochemicals®.
- Líquido fijador: GBX Fixer / Replenisher. Kodak®.
- Líquido revelador: GBX Developer / Replenisher. Kodak®.
- Mercaptoetanol: 2-mercaptoetanol. Bio-Rad®.
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>: ortovanadato sódico. Sigma Chemical Corporation®.
- Phadebas: Phadebas amylase test. Pharmacia LKB Biotechnology Inc®.
- Piruvato sódico: ácido pirúvico sal sódica. Fluka®.
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfónilo. Sigma Chemical Corporation®.
- Reactivo para la determinación de Western blotting ECL: Amersham®.
- Recombinante proteína A-agarosa: Upstate Biotechnology Incorporated®.
- SDS: lauril sulfato sódico. Sigma Chemical Corporation®.
- Tapsigargina: Biomol, Calbiochem®.
- Temed: N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina. Bio-Rad®.
- TPA: 13, acetato de 12, O-tetradecanoil forbol. Sigma Chemical Corporation®.
- Tris (Trizma base): (tris[hidroximetil] aminometano. Sigma Chemical Corporation®).

- Tris/glicina x10: Bio-Rad®.
- Tris/glicina/SDS x10: Bio-Rad®.
- Triton X-100: Bio-Rad®.
- Tween 20: Bio-Rad®.
- U-73122: 1-(6-((17β-3-metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-ilo) amino) hexil)-1H-pirrol-2,5-diona.  
Calbiochem®, Biomol®.

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

## 2.2. ANIMALES DE ESTUDIO

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

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

### ***2.3. MÉTODO DE AISLAMIENTO DE ACINOS PANCREÁTICOS***

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

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

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

La composición de la solución de lavado se indica a continuación:

*Composición de la solución de lavado*

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

El pH de esta solución se ajustó a 7,45 con NaOH 10N.

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

La suspensión obtenida se transfirió a tres tubos cónicos de plástico de 15 ml de capacidad donde se le añadió solución de parada a 4° C, con la finalidad de detener la digestión de la colagenasa.

*Composición de la solución de parada*

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

El pH de esta solución se ajustó a 7,45 con NaOH 10N.

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



*Composición de la solución de incubación*

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

El pH de esta solución se ajustó a 7,45 con NaOH 10N.

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

#### **2.4. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE AMILASAS**

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

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

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

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

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

*Composición de la solución de lisis*

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

El pH de esta solución se ajustó a 7,8.

La duración de la incubación fue de 30 minutos, al termino de los cuales se detuvo la secreción de amilasas centrifugando 300µl de cada muestra a las mismas condiciones que las *muestras cero*.

*Reacción de las amilasas con su sustrato*

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

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

*Composición del Reactivo de amilasas*

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

El pH de esta solución se ajustó a 7.

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

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

*Cálculo de la secreción de amilasas*

La secreción de amilasas se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

Donde :

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

$A_0$  : absorbancia de los tubos cero del mismo par de la serie experimental (media de los dos que se realizan)

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

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

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

## **2.5. DETERMINACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE TIROSINA**

Tras el desarrollo de la técnica del Southern blotting para identificar fragmentos de ADN en 1975, y del Northern blotting para el ARN, en 1979 se desarrolló la técnica del blotting de proteínas y se empezó a conocer como Western blotting (Gershoni, 1994). En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado la técnica del Western Blotting para la determinación de la fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas en estudio, p125<sup>FAK</sup> y paxilina.

Previamente se hicieron pruebas para determinar el tiempo idóneo que era necesario preincubar las células para que el nivel basal de fosforilación (incrementado por la acción mecánica ejercida por el método de aislamiento de los acinos pancreáticos) disminuyese hasta valores que nos permitiesen diferenciar con suficiente nitidez la fosforilación de proteínas estimulada de la que se produce en ausencia de estímulo. El estudio dio como resultado que el tiempo óptimo de preincubación de las células acinares es de 2 horas, a 37°C y con agitación suave.

Durante el tiempo de preincubación se añaden a la suspensión acinar aquellos inhibidores que precisen un tiempo previo de actuación para conseguir una inhibición óptima

(60 minutos para la tapsigargina y 120 minutos para el GF109203X, la exoenzima C3 de *C. botulinum*, la citocalasina D y la colchicina).

Tras la preincubación, la solución de células acinares se incubó a 37°C y 60 ciclos/min en presencia o no de secretagogos, a razón de 1 ml/muestra. Cada muestra se gasificó con oxígeno al 100% y la duración de la incubación, determinada mediante la realización de curvas de tiempo para los diferentes secretagogos (ver capítulo III), fue de 5 minutos.

Tras la incubación, cada muestra se centrifugó a 7.200 g durante 20 segundos, se aspiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en solución de lavado a 4°C, se centrifugaron nuevamente a las mismas condiciones, se aspiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en solución de lisis a 4°C y se sonicó. Tras la sonicación las muestras se depositaron sobre hielo a 4°C durante un periodo nunca inferior a 10 minutos. A continuación las muestras se centrifugaron a 4°C y 10.000 g durante 15 minutos, con la finalidad de separar la fracción celular insoluble (principalmente el citoesqueleto).

*Composición de la solución de lavado*

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>
NaCl	137mM
KCl	2,7mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,62mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,09mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0,2mM

El pH de la solución se ajustó a 7,2.

*Composición de la solución de lisis*

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>
NaCl	0,9%
Tris	50mM
Tritón X-100	10%
Deoxicolato	5%
Azida sódica	4%
EGTA	1mM
EDTA	0,4mM
Aprotinina	25µg/ml
Leupeptina	25µg/ml
PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo)	1mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0,2mM

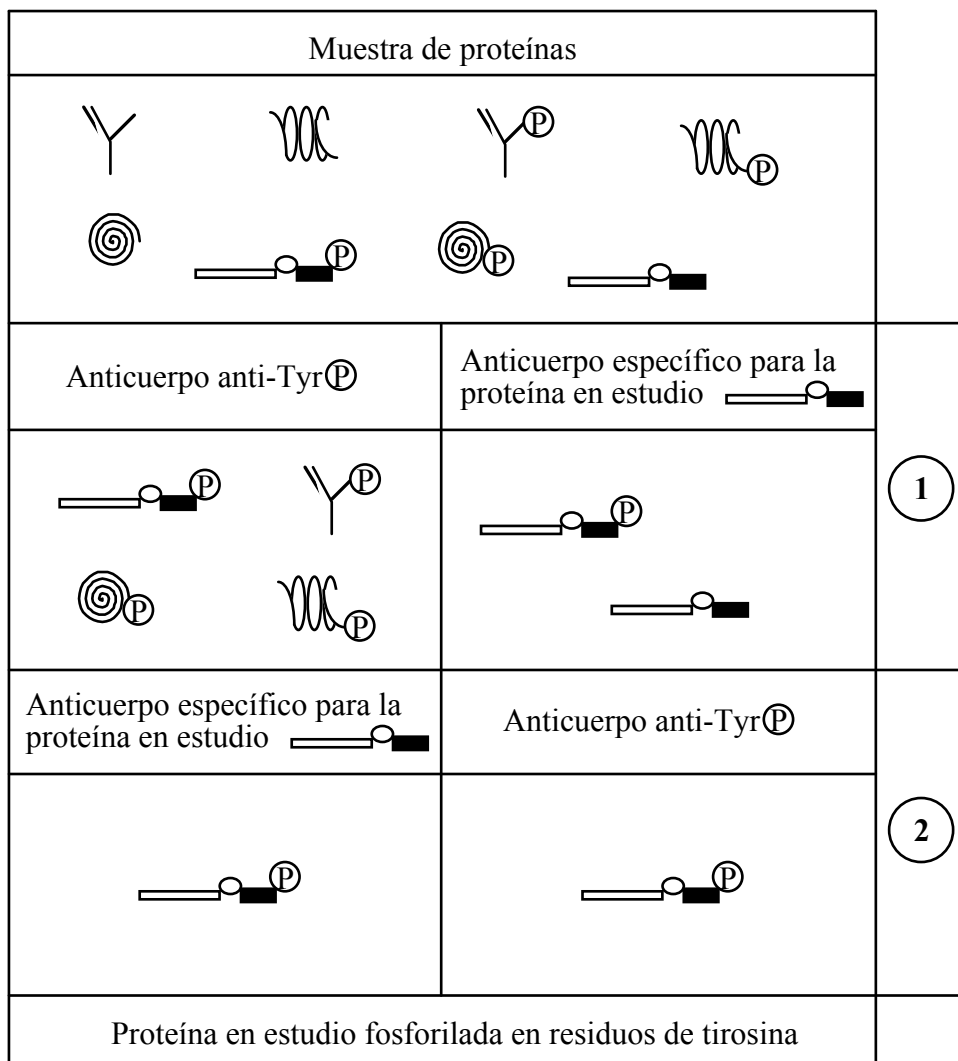
El pH de esta solución se ajustó a 7,5.

*Inmunoprecipitación*

Dado que las proteínas que queremos estudiar son proteínas que permanecen en la fracción soluble, tras la centrifugación permanecen en el sobrenadante de cada muestra. La inmunoprecipitación consiste en precipitar, con anticuerpos específicos, las proteínas objeto de estudio, para, en nuestro caso, separarlas posteriormente mediante electroforesis y transferirlas a una membrana de nitrocelulosa.

Llegados a este punto se pueden seguir dos vías, basadas en los mismos principios, para determinar la fosforilación de una proteína en restos de tirosina. La primera de ellas consiste en precipitar todas la proteínas que estén fosforiladas en residuos de tirosina; para ello se utiliza un anticuerpo monoclonal específico para restos de tirosina fosforilados y posteriormente estudiar la proteína deseada empleando para ello el anticuerpo específico para esta proteína. El resultado será lógicamente la cantidad de esta proteína que se ha fosforilado en restos de tirosina con el tratamiento. La segunda vía consiste en precipitar únicamente la proteína de estudio (fosforilada o no en restos de tirosina) con su anticuerpo específico y posteriormente estudiar la fosforilación en residuos de tirosina de esta proteína empleando para ello un anticuerpo específico para restos de tirosina fosforilados. El resultado obtenido es el mismo siguiendo ambas vías, como se describe en el esquema de la página siguiente.

Cada una de estas vías tiene sus ventajas sobre la otra. El primer modelo descrito permite estudiar la fosforilación en restos de tirosina en diferentes proteínas con la misma muestra, dado que en el último paso se puede incubar con diferentes anticuerpos específicos para cada una de estas proteínas. El segundo modelo en cambio nos permite realizar estudios de coimmunoprecipitación, es decir, cuando dos proteínas se encuentran físicamente unidas en la célula, al precipitar una de ellas mediante el empleo de un anticuerpo específico para dicha proteína, podrán identificarse las dos en el precipitado.



1. Inmunoprecipitación.

2. Immunoblotting.

El método seguido para la realización de esta Tesis Doctoral fue el descrito en primer lugar, así pues, el sobrenadante de cada muestra fue incubado, durante toda la noche, a 4° C, sometido a una mezcla constante por medio de un rotor, con 3µg del anticuerpo monoclonal anti tirosina fosforilada PY20 (isotipo IgG2b), a los que se añaden 25 µl de una solución de proteína A unida a agarosa (50% v/v) y 3 µg de anticuerpo específico para inmunoglobulina G (IgG) de



ratón que favorece la unión entre la proteína A y el anticuerpo PY20. La proteína A se une específicamente al fragmento Fc de la IgG del anticuerpo PY20, esta reacción es sumamente sensible y específica. La proteína A está unida a un soporte inerte que es la agarosa; de este modo el anticuerpo PY20, y con él las proteínas cuyos restos de tirosina están fosforilados, quedan unidos a un soporte que nos permite separarlas fácilmente por centrifugación del resto de las proteínas que permanecen en el sobrenadante, restringiendo las proteínas existentes en las muestras a aquellas en las que estamos interesados.

### Electroforesis y electrotransferencia

La electroforesis es una técnica eficaz de separación y análisis de las mezclas de proteínas que se encuentran en un material biológico. Se fundamenta en el hecho de que las velocidades de arrastre de las proteínas en un campo eléctrico dependen de la fuerza del campo eléctrico (E), la carga eléctrica neta de la proteína (Z) y la resistencia de fricción (F, que es función de la forma y el tamaño de la proteína). La velocidad de migración viene relacionada con estas variables por:

$$v = \frac{EZ}{F}$$

El pH del soporte material sobre el que se realiza la electroforesis también es importante. El punto isoeléctrico es el pH al cual no existe carga eléctrica en la proteína. A este pH, la movilidad de la proteína es cero, porque Z es cero. Por debajo del punto isoeléctrico, la molécula queda cargada positivamente; por encima del punto isoeléctrico está cargada negativamente.

Tras la inmunoprecipitación se centrifugaron las muestras a 4.000g durante 10 segundos con objeto de separar la agarosa, con las proteínas en estudio, del resto de proteínas, se aspira el sobrenadante y se añade tampón fosfato salino (PBS) a 4°C, con objeto de lavar las muestras. Esta operación se repitió dos veces, al término de lo cual se retiró todo el sobrenadante, se añadieron 15 ó 25 µl de tampón de carga (7,5% de mercaptoetanol) y se calentaron a 95°C durante 3 minutos para desnaturalizar las proteínas, proceso necesario para la separación de las mismas por electroforesis, así como para separar las proteínas en estudio del anticuerpo anti tirosina fosforilada y la proteína A.

*Composición del tampón fosfato salino (PBS)*

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>
NaCl	137mM
KCl	2,7mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,62mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,09mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47mM

El pH de la solución se ajustó a 7,40.

*Composición del tampón de carga*

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>
DTT (Ditiotreitol)	10mM
SDS	4%
Tris/ClH	50mM
Glicerol	5%
Bromofenol blue	0,5%
2-Mercaptoetanol	7,5%

Terminado el proceso de lavado y transferencia de las muestras al tampón de carga, se realizó la electroforesis.

El soporte de la electroforesis es un gel de acrilamida dividido en un gel superior o gel de carga con un 4% de acrilamida y un gel inferior o separador con un 10% de acrilamida. Las muestras se cargaron en los pozos y se hicieron migrar someténdolas a un voltaje de 80mV a lo largo del gel de carga y de 145mV a lo largo del gel separador. La duración de la electroforesis fue de 1 hora y 45 minutos. En la primera calle se cargó un estandar de proteínas marcadas, de peso molecular conocido, que posteriormente nos sirvió para conocer el peso molecular de las proteínas en estudio.

*Composición de los geles de electroforesis*

<b>Reactivos</b>	<b>Gel 4%</b>	<b>Gel 10%</b>
Acrilamida/Bisacrilamida	4%	10%
SDS	0,1%	0,1%
Tris/ClH pH 6.8	125mM	-
Tris/ClH pH 8.8	-	375mM
TEMED	0,1%	0,05%
APS (Persulfato amónico)	0,05%	0,05%

*Composición del tampón de electroforesis*

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>
Tris	2,5mM
SDS	0,01%
Glicina	19,2mM

La solución de electroforesis tiene un pH de 8,3.

Concluida la electroforesis se transfirieron las proteínas desde el gel de acrilamida hasta una membrana de nitrocelulosa, que es un soporte más estable para realizar los estudios posteriores. Para la transferencia se sometió a las proteínas a un campo eléctrico, empleando un amperaje de 250 A durante 3 horas con refrigeración continua.

*Composición del tampón de transferencia*

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>
Tris	2,5mM
Glicina	19,2mM
Metanol	20%

Al terminar la transferencia las membranas se incubaron con solución de bloqueo. La solución de bloqueo tiene una alta concentración de proteínas, y su empleo disminuyen la unión inespecífica del anticuerpo a la membrana. La incubación puede hacerse de dos formas: durante toda la noche a 4°C sin agitación o durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua.

*Composición de la solución de bloqueo*

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>
NaCl	0,46%
Tris	50mM
Cl <sub>2</sub> Ca	20mM
Tween 20	0,05%
Leche en polvo	5%
Azida sódica	0,02%

El pH de la solución se ajustó a 8.

*Inmunoblotting*

Tras el bloqueo de la membrana se procedió a la incubación de la misma con el anticuerpo específico de la proteína objeto de estudio.

Transcurrido el tiempo de incubación las membranas se lavaron dos veces con solución de bloqueo para retirar el anticuerpo que no está unido específicamente a la proteína estudiada (unión inespecífica). El lavado consistió en incubar las membranas con dicha solución durante 3 minutos y con agitación constante.

Posteriormente se incubaron las membranas con un anticuerpo que está conjugado con una enzima (peroxidasa), que permite detectar las proteínas presentes en las muestras a través de una reacción de quimioluminiscencia. El anticuerpo, que se diluyó en solución de bloqueo 1:750, es un anticuerpo policlonal específico para unirse a IgG de ratón (especie de la que proceden los anticuerpos con los que se realizó la primera incubación). La incubación se realizó durante 1 hora, con agitación constante y a temperatura ambiente.

Al término de esta última incubación las membranas se volvieron a lavar siguiendo el procedimiento anteriormente explicado: dos veces con solución de bloqueo y dos veces con solución A.

*Composición de la solución A*

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final</b>
NaCl	0,46%
Tris	50mM
Cl <sub>2</sub> Ca	20mM
Tween 20	0,05%

El pH de la solución se ajustó a 8.

*Detección*

La detección de las proteínas se realizó incubando las membranas durante 1 minuto con un sustrato de la peroxidasa que se encuentra unida al último anticuerpo mencionado, de este modo se produce una reacción de quimioluminiscencia y la luz producida es capaz de impresionar un film.

El sustrato utilizado fue el reactivo para detección de Western Blotting, ECL®. La incubación se realiza en un volumen mínimo (0,05 ml por cm<sup>2</sup> de membrana).

A continuación se expone un film a la luz liberada por la reacción de quimioluminiscencia entre la peroxidasa y su sustrato. Aquellas zonas de la membrana donde se produjo esta reacción impresionaron al film. Posteriormente se procedió al revelado del mismo. Todo este proceso se lleva cabo en una cámara oscura.

Por último se midió la densidad de las manchas de cada proteína con ayuda de un densitómetro (Sun Microsystems, Inc, Mountain View, CA). El densitómetro mide en primer lugar la densidad óptica de cada mancha y posteriormente integra este valor para todo el área de la mancha, así pues los dos parámetros a medir fueron densidad óptica y área de cada mancha. Este valor es indicativo de la cantidad de proteína que se ha fosforilado en restos de tirosina con el tratamiento en estudio.

## 2.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

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

Cuando los resultados se obtuvieron con el método de la secreción de amilasas se han presentado como tanto por ciento de la secreción de amilasas, respecto a la secreción total, frente al logaritmo de la concentración del estímulo. Todos los datos se expresan como valores sobre la secreción basal. Los resultados obtenidos empleando la técnica del Western Blotting se representan gráficamente como incremento neto (incremento de la fosforilación en residuos de tirosina obtenido en presencia de estímulo, dividido por el valor obtenido en ausencia de estímulo), como tanto por ciento de la respuesta máxima (obtenida con el secretagogo cuyo efecto es estudiado), o bien como el tanto por ciento del control (valor obtenido con el secretagogo estudiado a una concentración diferente de la que produce el efecto máximo). Los resultados obtenidos empleando el método de la determinación de calcio intracelular se expresan como  $[Ca^{2+}]_i$  en molaridad.

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

CAPÍTULO 3

TIROSINAS CINASAS. LA P125<sup>FAK</sup>

### **3.1. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1.1. LAS PROTEÍNAS TIROSINAS CINASAS.**

Los secretagogos del páncreas actúan principalmente vía dos mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción, como se describió en el capítulo I. En el caso de la secretina y péptidos relacionados activando la adenilato ciclasa e incrementando los niveles de AMPc. La CCK, el carbacol o la bombesina activan la PLC, que hidroliza fosfoinosítidos generando DAG e Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. Subsecuentemente el DAG y Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> activan proteínas serina-treonina cinasas como la PKC o provocan la liberación de Ca<sup>2+</sup>, desde depósitos intracelulares, al citosol. Estos dos mecanismos potencian sus efectos en algunas circunstancias y se cree que son las vías intracelulares más importantes en el páncreas exocrino (Williams y Yule, 1993).

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

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

Un gran número de tirosinas cinasas, especialmente aquellas que están reguladas por segundos mensajeros, poseen un dominio regulador que se une al dominio catalítico, impidiendo de este modo que algún sustrato pueda acceder a dicho dominio. La unión del segundo mensajero al dominio regulador modifica la conformación de la proteína, lo que ocasiona que el dominio catalítico quede libre y la proteína esté activa. Este hecho explica porqué la proteólisis de algunas tirosinas cinasas provoca su activación (Bolen, 1993).



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

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

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

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

2) *Familia del receptor de la insulina*. Esta familia comprende tanto el receptor de la insulina como al del IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina-1). Estos dos receptores son muy similares, de hecho, ambos péptidos pueden unirse al otro tipo de receptor aunque la afinidad por él es menor que por el suyo propio (Hardie, 1991).

3) *Familia del receptor del PDGF*. Los receptores de esta familia se caracterizan por la inserción de aproximadamente 100 aminoácidos en el centro del dominio con actividad tirosina cinasa. El dominio extracelular contiene cinco secuencias de aminoácidos homólogas repetidas, con una estructura que se asemeja a la de las inmunoglobulinas (Hardie, 1991)

Se cree que ambos grupos de tirosinas cinasas, citosólicas y unidas a receptor, participan en la transducción de señales y tienen un papel muy importante en la división y

proliferación celular (Campbell y cols., 1992; Davis, 1993). Recientemente también se ha propuesto la participación de las tirosinas cinasas en la regulación de la secreción pancreática exocrina (Duan y cols., 1994). En el capítulo VI se profundizará más en el estudio del papel de las tirosinas cinasas en la secreción pancreática.

Actualmente hay descritos numerosos procesos en los que participan las proteínas tirosinas cinasas. Entre los procesos más estudiados se encuentran los que median la respuesta a los factores de crecimiento. La unión de un factor de crecimiento al dominio externo del receptor origina, tras un proceso de dimerización del mismo en el caso del PDGF, la autofosforilación del dominio intracelular, el cual se convierte en activador de un complejo multimolecular que incluye un gran número de proteínas con actividad enzimática, entre las que se encuentran la PLC $\gamma$ , la PI3-cinasa y numerosas proteínas que actúan a modo de adaptadores proteicos (Shc, Grb2, etc) (Schlessinger y Ullrich, 1992). Las proteínas adaptadoras inician toda una cascada de señales: inicialmente se produce la activación de proteínas de la familia de GTPasas de bajo peso molecular, Ras. Ras unida a GTP activa a la proteína cinasa citosólica c-raf, que a su vez fosforila a la proteína MAP cinasa cinasa (o MEK cinasa), esta fosforila a las MAP cinasas y estas a su vez fosforilan a otras proteínas incluyendo la proteína ribosomal S6 cinasa, la PLA<sub>2</sub> citosólica y factores relacionados con la transcripción genética (Egan y Weinberg, 1993; Malarkey y cols., 1995). Además de los factores de crecimiento, la ruta de las MAP cinasas puede ser también activada por la ocupación de receptores acoplados a proteínas G de membrana, como la vasopresina, la angiotensina o la CCK (Davis, 1993; Duan y Williams, 1994). Duan y cols. (1995) demostraron que la CCK, así como la activación de la PKC, producen la activación tanto de Ras como de las MEK cinasas en acinos pancreáticos de rata. Recientemente se ha observado que los receptores muscarínicos M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>, cuya activación tiene ciertos efectos tróficos, están relacionados con las MAP cinasas (Gutkind y cols., 1997). Se ha identificado una nueva familia de tirosinas cinasas, íntimamente relacionadas con las MAP cinasas, que participan en los procesos de crecimiento y proliferación celular. Estas cinasas se han identificado en virtud a su capacidad para fosforilar el extremo amino terminal del factor c-Jun, por lo que se les ha denominado c-Jun amino-terminal cinases (JNK) (Hibi y cols., 1993). Se han identificado dos formas con masas moleculares de 46 y 55 KDa, las cuales son fosforiladas, al igual que las MAP cinasas, en residuos de treonina y tirosina (Dérijard y cols., 1994; Kyriakis y cols., 1994). Al igual que las MAP cinasas, las JNK cinasas pueden ser activadas por secretagogos clásicos como la CCK (Dabrowski y cols., 1996) o el carbacol a través de la activación de receptores muscarínicos M<sub>1</sub> expresados en células NIH 3T3 (Coso y cols., 1995).

Las tirosinas cinasas también participan en los mecanismos iniciados tras la ocupación del receptor de la hormona del crecimiento (GH). Cuando la GH se une a su receptor, este interacciona con una tirosina cinasa citoplasmática, la tirosina cinasa asociada al receptor de la GH, JAK2 (Argetsinger y cols., 1993). La JAK2 es un miembro de la familia de tirosinas cinasas citoplasmáticas *Janus* que agrupa las siguientes proteínas: JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2 (Wilks y cols., 1991; Witthuhn y cols., 1994; Carter-Su y cols., 1996). JAK2 produce la activación de diferentes proteínas intracelulares entre las que se encuentra la PLC, la PI3 cinasa y la cascada de las MAP cinasas descrita anteriormente (Carter-Su y cols., 1996).

Otra familia de tirosinas cinasas son las proteínas de la familia Src. Entre los miembros de esta familia se encuentran la p60<sup>src</sup>, proteína que está íntimamente relacionada con las placas de adhesión focal y con la FAK y que se sobreexpresa en células transformadas por el virus del Sarcoma de Rous (v-Src) (Kanner y cols., 1990), la p59<sup>fyn</sup> y la p56<sup>lck</sup>. En linfocitos T y B las Src cinasas p59<sup>fyn</sup> y p56<sup>lck</sup> estimulan la fosforilación de residuos de tirosina de, las a su vez tirosinas cinasas, p70<sup>zap</sup> y p72<sup>syk</sup>, respectivamente, que desencadenan la fosforilación de un gran número de proteínas (Taniguchi y cols., 1991).

Está bien descrito que los procesos de crecimiento y división celular implican cambios en la estructura del citoesqueleto (Malarkey y cols., 1995). El inicio de los mecanismos proliferativos fisiológicos está relacionado con las interacciones entre la célula y la matriz extracelular y con las células vecinas y con cambios en la morfología celular. Estos cambios dan lugar a la fosforilación de una serie de proteínas relacionadas con el citoesqueleto, entre estas se encuentra una proteína asociada a las placas de adhesión focal, aislada inicialmente en 1990 por Parsons y sus colaboradores a la que se denominó cinasa de adhesión focal (p125<sup>FAK</sup>). El nombre se debe a su peso molecular y a la asociación a estas placas (Kanner y cols., 1990; Malarkey y cols., 1995).

### 3.1.2. LA p125<sup>FAK</sup>

La p125<sup>FAK</sup> o FAK es una proteína cuya estructura se ha conservado en las diferentes especies. La FAK es el prototipo de una pequeña familia de proteínas tirosinas cinasas constituida por la FAK y la "prolin-rich tyrosine kinase 2/cell adhesion kinase  $\beta$ " (PYK2/CAK $\beta$ ) (Sasaki y cols., 1995). La FAK y la PYK2/CAK $\beta$  presentan una identidad del 45% en su secuencia de aminoácidos (el 60% en el dominio catalítico), pero a pesar de su homología estas dos tirosinas cinasas no se localizan en el mismo sitio; mientras la FAK se localiza en las placas de adhesión focal, la PYK2/CAK $\beta$  se localiza en los lugares de contacto célula-célula y parece estar regulada por los cambios en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Sasaki y cols., 1995). No obstante, a pesar de sus diferencias moleculares y de localización, se cree que se relacionan con las mismas moléculas. Dado que la proteína objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral es la FAK nos referiremos únicamente a ella en adelante.

La proteína FAK es una tirosina cinasa localizada en las placas de adhesión focal de las células, por lo que también se denomina p125<sup>FAK</sup> o simplemente FAK ("Focal Adhesion Kinase") (Hanks y cols, 1992). La estructura de dicha proteína es diferente de la de otras tirosinas cinasas conocidas. En el caso de la FAK el dominio catalítico está flanqueado por dos dominios no catalíticos que presentan pequeñas secuencias similares a otras proteínas presentes en las bases de datos existentes (Hanks y cols., 1992).

La FAK se expresa en la mayoría de los tejidos y líneas celulares examinados hasta la fecha (Hanks y cols, 1992); en algunos de ellos el extremo carboxilo terminal se expresa autónoma e independientemente como una proteína de 40 kDa denominada proteína no cinasa relacionada con la FAK (FRNK o p41<sup>FRNK</sup>; Schaller y cols 1993).

Un hecho notable observado al estudiar la estructura de la FAK es la ausencia de dominios SH2 y SH3, dominios que están presentes en las cinasas de la familia Src y en otras proteínas tirosinas cinasas citoplasmáticas (Pawson y Gish, 1992). La carencia de dominios SH2 y SH3 en la FAK sugiere que esta proteína podría jugar un papel en la fisiología celular diferente al caracterizado previamente para otras tirosinas cinasas no unidas a receptor; también es probable que los dominios no catalíticos de la FAK participen dirigiendo las interacciones proteína-proteína que regulan y controlan la función de la FAK (Parsons y cols, 1994).

Estructuralmente presenta un extremo amino terminal, no catalítico, que está relacionado con la asociación de esta proteína a la porción citoplasmática de las integrinas. Péptidos sintéticos que mimetizan los dominios citoplasmáticos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  de las integrinas son

capaces de unirse a la FAK en células embrionarias lisadas de pollo (Schaller y Parsons, 1995). La unión directa de la FAK a las integrinas y la fosforilación en restos de tirosina de la FAK dependiente de la adhesión celular sugieren que las integrinas podrían regular directamente la actividad tirosina cinasa de la FAK (Parsons y cols, 1994).

El extremo carboxilo terminal está relacionado con la localización de la FAK en las placas de adhesión focal de las células, así como con la unión a la paxilina. Estudios recientes demuestran que entre los aminoácidos 853 y 1012 se localiza una secuencia denominada *Focal Adhesion Targeting* o FAT que es necesaria para la localización correcta de la FAK a las placas de adhesión focal. (Parsons y cols, 1994).

La paxilina, que se describirá más adelante en profundidad, es una proteína asociada al citoesqueleto que se encuentra estrechamente relacionada con la FAK en las placas de adhesión. La interacción entre estas dos proteínas parece ser directa, dado que ambas pueden coimmunoprecipitar usando anticuerpos específicos anti-FAK o anti-paxilina, lo cual indica que estas proteínas se encuentran establemente relacionadas in vivo (Schaller y Parsons, 1995). Experimentos in vitro, estudiando diferentes péptidos de la FAK para determinar la secuencia de aminoácidos a la que se une la paxilina, indicaron inicialmente que entre los aminoácidos 687 y 1052 existe una secuencia a la cual la paxilina podría unirse eficazmente; dicha secuencia se encuentra en el extremo carboxilo terminal de la FAK (Parsons y cols, 1994). Recientemente, Tachinaba y cols. (1995) demostraron que la secuencia de aminoácidos localizada entre los residuos 919 y 1042 es suficiente para que se una la paxilina. Todos los estudios realizados indican que el dominio carboxilo terminal estaría relacionado con la localización de la FAK en las placas de adhesión focal y con la unión directa a sustratos celulares potenciales, como la paxilina, y posiblemente estos dos fenómenos formen parte del mismo proceso, la localización de la FAK en las placas de adhesión, lo que permite su relación con las integrinas (Parsons y cols., 1994; Tachinaba y cols., 1995).

Se ha observado la activación de la FAK en respuesta a tres estímulos de muy diferente naturaleza, la activación celular por neuropeptidos, lípidos activos y factores de crecimiento (Zachary y cols, 1992; Zachary y cols, 1993; Malarkey, 1995), la adhesión celular a moléculas de la matriz extracelular vía integrinas (Burrige y cols., 1992) y en células transformadas por cinasas oncogénicas de la familia src (Guan y Shalloway, 1992). Estos datos sugieren que la FAK podría representar un punto de convergencia entre los mecanismos de acoplamiento estímulo-respuesta de los receptores acoplados a las proteínas G de membrana, de los factores de crecimiento, de las integrinas y de los oncogenes (Rozenfurt, 1995).

En células transformadas por el virus del sarcoma de Rous (Src) la fosforilación de la FAK en restos de tirosina se ve incrementada varias veces sobre su valor en las células normales. Esta observación apoya la hipótesis que considera a la FAK como el sustrato original de la p60<sup>src</sup>, cuya actividad se ve varias veces incrementada en este tipo de células (Kanner y cols, 1990). En estas células la mayoría de la FAK (>80%) se encuentra establemente unida a la p60<sup>src</sup> (Cobb y cols, 1994). Estudios realizados in vitro sobre la formación del complejo FAK-p60<sup>src</sup> indican que, para la formación de dicho complejo, son necesarios tanto el dominio SH2 de la p60<sup>src</sup> como el lugar de autofosforilación de la FAK (Schaller y cols, 1994).

Tras la activación de la FAK, por cualquiera de los mecanismos mencionados, esta se autofosforila (Malarkey y cols., 1995). Se ha identificado el aminoácido tirosina localizado en la posición 397 (Tyr<sup>397</sup>) como el principal residuo donde se produce la autofosforilación de la FAK (Schaller y cols, 1994). La sustitución de la Tyr<sup>397</sup> por fenilalanina bloquea eficazmente las interacciones entre la FAK y la p60<sup>src</sup> tanto in vivo como in vitro. La Tyr<sup>397</sup> se localiza en el extremo amino-terminal, muy próxima al dominio catalítico y al lugar de unión del ATP. Aparte del mencionado residuo Tyr<sup>397</sup>, la FAK tiene otros residuos de tirosina susceptibles de ser fosforilados. El lugar de autofosforilación de la FAK (Tyr<sup>397</sup>) representa un lugar de unión para la p60<sup>src</sup> y la p59<sup>fyn</sup>. Cuando la p60<sup>src</sup> se une a la FAK fosforila los residuos de tirosina localizados en las posiciones 407, 576 y 577, estimulando su actividad (Calalb y cols., 1995). Otro lugar de fosforilación de la FAK recientemente identificado es el Y10. Este residuo es fosforilado eficazmente por las proteínas de la familia src in vitro (Calalb y cols., 1995).

Los residuos Tyr<sup>576</sup> y Tyr<sup>577</sup> se encuentran en el subdominio VIII, una región que está muy bien conservada en diferentes tirosinas cinasas (Hanks, 1991). En la práctica totalidad de proteínas tirosinas cinasas existen residuos de tirosina en el dominio VIII y, generalmente, la fosforilación de estos residuos supone un incremento en la actividad tirosina cinasa (Calalb y cols., 1995).

El lugar de la FAK conocido como Y10 todavía no está bien identificado. La fosforilación de este residuo, así como del Tyr<sup>407</sup>, podría servir para reclutar otras proteínas, a través de sus dominios SH2, en el complejo de las placas de adhesión focal, como un paso clave en la transmisión de las señales hacia el interior celular (Chen y cols., 1994). Recientemente, se ha comprobado que los procesos de adhesión celular provocan la interacción entre la FAK y el adaptador proteico Grb2, a través de su dominio SH2 (Chen y cols., 1994).

## **REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FAK.**

### A. Papel de las integrinas

Las integrinas constituyen la principal familia de receptores celulares que participan en la relación entre la célula y la matriz extracelular, así como en las interacciones célula-célula. Las interacciones en las que participan las integrinas están muy relacionadas con la regulación de un gran número de funciones celulares, entre ellas el desarrollo embrionario, el crecimiento de células tumorales, la metástasis, la apoptosis, la hemostasia, la activación de los leucocitos o la respuesta de las células a la presión (Clark y Brugge, 1995).

Las integrinas son heterodímeros, compuestos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , seleccionadas de entre 16 tipos diferentes de subunidades  $\alpha$  y 8 tipos de subunidades  $\beta$ . Con estos tipos de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se producen los 20 diferentes heterodímeros de integrinas descritos en la actualidad (Clark y Brugge, 1995).

Ambas subunidades de integrinas tienen dominios tanto extra como intracelulares. El corto dominio intracelular carece de actividad enzimática intrínseca, y se cree que funciona acoplándose a dos tipos distintos de proteínas: el primer tipo son proteínas citoplasmáticas que inducen la formación de grandes complejos proteicos; entre ellas se encuentran tanto proteínas del citoesqueleto como proteínas que intervienen en la formación y organización de las placas de adhesión (Sastry y Horwitz, 1993). El segundo tipo son proteínas que regulan la formación de dichas placas de adhesión focal (Sastry y Horwitz, 1993).

Una de las funciones principales de las integrinas es la transmisión de señales de la matriz extracelular al citoplasma. Esta función de las integrinas se cree que tiene una gran importancia biológica (Parsons y cols, 1994). Sobre la base de estos hechos se ha especulado que la interrelación de las integrinas con la matriz extracelular podría dar como resultado la activación de la FAK. Una consecuencia directa de esta activación es la autofosforilación de la FAK, y por consiguiente, la formación de un lugar de alta afinidad para la unión de la p60<sup>src</sup> o de otras cinasas de la familia Src (Parsons y cols, 1994). Qué parte de las integrinas produce la activación de la FAK ha sido uno de los temas de estudio por muchos investigadores en los últimos años. Recientemente, Akiyama y cols. (1994) han observado que la subunidad  $\beta$  de las integrinas es la responsable de esta activación y parece que el extremo carboxilo terminal es la región implicada en este proceso (Otey, 1996).

Estudios recientes, llevados a cabo con dos formas mutantes de integrinas, transferidas a células CHO-K1, el tipo  $\alpha_{IIb}\beta_3$ (D723A/E726A) que tiene alterado el lugar de unión a la FAK, y el tipo  $\alpha_{IIb}\beta_3$ (F727A/K729E/F730A), que tiene alterado el lugar de unión a la  $\alpha$ -actinina, han puesto de manifiesto que la fosforilación de la FAK en respuesta a la activación de las integrinas se produce por dos fenómenos independientes diferentes: la formación de las placas de adhesión focal, que produce activación de la FAK, y la activación directa por las integrinas. Por lo tanto, la activación de las integrinas causa la fosforilación de la FAK tanto directa como indirectamente (Lyman y cols., 1997).

### B. Papel de la FRNK

La p41/43<sup>FRNK</sup> (FRNK) es una forma autónoma de la FAK de 41-43 KDa compuesta únicamente por el extremo carboxilo-terminal no catalítico de la FAK, que ha sido identificada únicamente en células embrionarias; en células y tejidos aviares FRNK es codificada por un ARNm de 2,4 Kb (Schaller y cols 1993), y en las células humanas un ARNm de tamaño similar codifica esta proteína (Parsons y cols, 1994). Recientemente, Otey (1996) ha descrito que la sobreexpresión de la FRNK disminuye la fosforilación de la FAK y enlentece los fenómenos de desplazamiento celular estimulados por fibronectina. No está muy claro cual puede ser el proceso por el cual la FRNK regula la actividad de la FAK, se cree que ambas proteínas compiten por el mismo sustrato y al producirse una sobreexpresión de la FRNK se produce una inhibición competitiva (Otey, 1996). Si la expresión de la FRNK está limitada a células embrionarias parece lógico pensar que pueda existir alguna otra proteína reguladora en células no embrionarias.

### C. Regulación a través de otros receptores de membrana y convergencia de diferentes rutas intracelulares

Hace unos años surgió una nueva idea enmarcada en los procesos de regulación de la FAK, en el sentido que la FAK podría ser activada por una serie de agentes independientes de las integrinas. Así, se ha demostrado que factores de crecimiento como el PDGF (Rankin y Rozengurt, 1994), lípidos activos como el ácido lisofosfatídico (Seufferlein y Rozengurt, 1994), péptidos mitogénicos como la bombesina, la vasopresina (Sinnott-Smith y cols., 1993; Zachary y cols., 1993), las endotelinas (Zachary y cols., 1993), la bradicinina (Leeb-Lundberg y cols., 1994), la angiotensina II (Polte y cols., 1994) y la CCK-8 (Seufferlein y cols., 1995; Taniguchi y cols., 1996) y neurotransmisores como el agonista colinérgico, carbacol (Gutkind y Robbins, 1992) estimulan la fosforilación de la FAK en residuos de tirosina. En algunos casos, se ha observado que la regulación de la FAK requiere la integridad de los filamentos de actina; así, la



estimulación de fibroblastos con bombesina no produce ningún incremento en la fosforilación de la FAK si los microfilamentos han sido desorganizado por efecto de la citocalasina D (Sinnott-Smith y cols., 1993). Estas observaciones hicieron suponer que la activación de la FAK por los agentes descritos era dependiente de la estimulación de las integrinas; sin embargo, los factores de crecimiento y neuropéptidos citados pueden activar a la FAK independientemente de las integrinas, lo que indica que la FAK es un punto de convergencia entre diferentes vías de acoplamiento estímulo-respuesta (Rozengurt, 1995; Otey, 1996).

A los receptores acoplados a las proteínas G de membrana se les ha asociado diferentes funciones, entre ellas la embriogénesis, la regeneración tisular, la estimulación del crecimiento y las neoplasias (Rozengurt, 1986). No obstante, al carecer de actividad tirosina cinasa intrínseca, como se ha observado en los receptores de los factores de crecimiento, se ignoraba si su ocupación estimulaba la fosforilación de la FAK en residuos de tirosina. Gutkind y Robbins en 1992 demostraron que el carbacol incrementa, de forma dependiente de la concentración, la fosforilación de un gran número de proteínas en fibroblastos donde se habían transferido receptores muscarínicos; entre estas proteínas se encuentran la FAK, la p130<sup>cas</sup> y la PI3-cinasa. Sin embargo, el mecanismo intracelular que media esta activación es aun poco conocido (Gutkind y Robbins, 1992).

La CCK estimula la fosforilación en residuos de tirosina de una gran número de proteínas intracelulares, cinasas o no, entre las que se encuentran las JUN cinasas y las MAP cinasas (Duan y Williams, 1994; Duan y cols., 1995; Dabrowski y cols., 1996). La fosforilación en residuos de tirosina es uno de los procesos más importantes en la acción de un gran número de neuropéptidos, que actúan como potentes factores de crecimiento celular al unirse a receptores acoplados a proteínas G de membrana, pudiendo mediar sus efectos tróficos y los cambios en el citoesqueleto (Zachary y cols., 1992; Leeb-Lundberg y cols., 1994). Como se mencionó en el primer capítulo, se han descrito dos tipos de receptores para la CCK-8, el receptor CCK<sub>A</sub> y el receptor CCK<sub>B</sub>/gastrina. Seufferlein y cols. en 1995 y Taniguchi y cols. en 1996 han descrito que la ocupación del receptor CCK<sub>B</sub>/gastrina transferido en fibroblastos Rat-1 o en células NIH3T3 estimula la fosforilación de la FAK y de la paxilina, así como la formación de fibras de tensión, la activación de las MAP cinasas y la mitogénesis tras la hidrólisis de inositol fosfato y del incremento en la concentración de calcio intracelular. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito que la ocupación del receptor CCK<sub>A</sub> tenga efecto alguno en la fosforilación de la FAK y la paxilina. En células acinares pancreáticas de rata, a diferencia de lo que ocurre en hombre o cobaya, solo se han descrito receptores CCK<sub>A</sub> (Zhou y cols., 1995), por lo que es un especie idónea para estudiar si este tipo de receptor de la CCK estimula la fosforilación de la FAK en residuos de tirosina.

Recientemente se ha comprobado que la bombesina induce la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina en fibroblastos 3T3, a través de una vía independiente de la PKC y el calcio citosólico (Sinnnet-Smith y cols, 1993). La fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por bombesina requiere la integridad del citoesqueleto de actina y que el factor Rho esté funcional (Sinnnet-Smith y cols, 1993). Las tirfostinas, inhibidores de las tirosinas cinasas, reducen la fosforilación de la FAK y la paxilina inducida por bombesina en células 3T3 (Charlesworth y cols., 1996). Estos datos sugieren que las proteínas tirosinas cinasas participan en la fosforilación de la FAK y la paxilina provocada por la bombesina en estas células (Charlesworth y cols., 1996). La fosforilación de la FAK y la paxilina indica que éstas proteínas participan en las vías de acoplamiento estímulo-respuesta de la bombesina, así como también podrían hacerlo para otros neuropéptidos; sin embargo, los componentes de estas vías todavía no han sido completamente identificados (Rankin y cols, 1994). La trombina, sin embargo, estimula la fosforilación en restos de tirosina de la FAK en plaquetas por una vía dependiente de la proteína cinasa C y el calcio citosólico (Clark y Brugge, 1995). Los resultados descritos sugieren que los receptores acoplados a las proteínas G de membrana podrían cooperar con las integrinas amplificando las señales inducidas por la activación de estas últimas (Clark y Brugge, 1995).

La insulina también participa en la regulación de la FAK. Estudios recientes llevados a cabo por Pillay y cols. (1995) en fibroblastos Rat-1 y Knight y cols. (1995) en células CHO han demostrado que la insulina estimula la defosforilación de la FAK y reduce la formación de fibras de tensión. La relación entre la defosforilación de la FAK y la estimulación con insulina podría ser una tirosina fosfatasa denominada SHPTP2 que participa en la cascada de señales iniciada por la insulina (Yamauchi y cols., 1995).

El efecto de ciertos factores de crecimiento en la FAK es muy complejo, siendo uno de los ejemplos más claro el del PDGF. El efecto del PDGF en la fosforilación de la FAK depende no solo de la isoforma del PDGF, sino también de la concentración empleada e incluso del tipo de célula estudiado. Así, el PDGF-BB es capaz de estimular la fosforilación de la FAK en células musculares de aorta de ratón en tanto que el PDGF-AA no produjo este efecto (Abedi y cols., 1995). Por otro lado ambas formas del PDGF estimulan la fosforilación de la FAK en fibroblastos 3T3 a bajas concentraciones; sin embargo, a concentraciones altas no tienen ningún efecto en la FAK (Rankin y Rozengurt, 1994).

El ácido lisofosfatídico (LPA) también estimula la fosforilación de la FAK. El LPA es un constituyente fisiológico del suero y el principal responsable de su actividad como promotor del crecimiento. El LPA es un fosfolípido mitogénico que induce la fosforilación de múltiples

proteínas, entre ellas la MAP-cinasa y la FAK (Kumagai y cols., 1993). La estimulación de células con suero o con LPA ocasiona una rápida formación de placas de adhesión focal y fibras de tensión; este fenómeno estaría relacionado con la fosforilación de la FAK en residuos de tirosina (Chrzanowska-Wodnicka y Burridge, 1994).

Algunos autores (Ridley y Hall, 1992) han comprobado que las proteínas de la familia de GTPasas de bajo peso molecular, Rho, participan en la formación de las placas de adhesión focal y de las fibras de tensión de actina. Dado que la activación de la FAK presenta una alta correlación con la organización del citoesqueleto de actina y la constitución de las placas de adhesión focal (Rankin y Rozengurt, 1994) estudiaron la posible relación entre ambas proteínas. La inhibición de Rho mediante el tratamiento de las células con la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* que produce ADP-ribosilación del residuo de asparragina localizado en la posición 41 de la molécula de Rho (Sekine y cols., 1989), reduce notablemente la formación de fibras de tensión estimulada por bombesina y paralelamente reduce la fosforilación de la FAK y la paxilina en restos de tirosina. Estos datos sugieren que la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por la bombesina en células 3T3 depende de la actividad de Rho (Rankin y cols., 1994). En el capítulo V se profundizará más en el estudio de las GTPasas de bajo peso molecular de la familia Rho.

#### D. Regulación por productos de oncogenes

La transformación celular provocada por el v-Src es un proceso complejo que produce la generación de una serie de señales que dirigen un crecimiento incontrolado y una serie de perturbaciones en la estructura celular y en su comportamiento (Fincham y cols., 1995). La capacidad del v-Src para inducir cambios en la morfología celular es independiente de la función nuclear, y más bien parece estar relacionado con la actividad tirosina cinasa en la periferia celular. La activación de la p60<sup>src</sup> es un proceso complejo que conlleva reacciones de fosforilación y defosforilación de esta proteína. La fosforilación del residuo de tirosina 527 del extremo carboxilo terminal inhibe la actividad de la p60<sup>src</sup>. Su activación ocurre tras la defosforilación del residuo de tirosina Tyr<sup>527</sup> (Lee y Villereal, 1996). La actividad de la Src estimula tanto la fosforilación de la FAK en residuos de tirosina, como la desorganización de las placas de adhesión focal; esto da lugar a que la célula afectada se independice del medio que la rodea (Fincham y cols., 1995). El hecho de que este virus provoque la fosforilación de la FAK dando lugar a la formación de placas de adhesión focal y al mismo tiempo cause la desintegración de dichas placas es paradójico. El virus del Sarcoma de Rous inicialmente estimula la fosforilación de la FAK en residuos de tirosina, pero seguidamente induce su degradación previamente a que la célula se independice de su entorno (Fincham y cols., 1995).

Resultados obtenidos por Ilic y cols. (1995) en células embrionarias deficientes en FAK han sugerido que la función de la FAK está encaminada hacia la reorganización de las placas de adhesión focal, no a su formación. El papel de la FAK en la reestructuración de las placas de adhesión podría explicar la independización del medio de las células transformadas por el virus del Sarcoma de Rous, ya que la sobreexpresión de la FAK daría como resultado la aparición de un menor número de placas de adhesión en estas células (Ilic y cols., 1995).

En las células normales la actividad enzimática de la p60<sup>src</sup> y de la p59<sup>fyn</sup> (otra tirosina cinasa de la familia Src que forma complejos con la FAK en células embrionarias de pollo; Cobb y cols., 1994) está inhibida debido a la fosforilación de un residuo de tirosina localizado en el extremo carboxilo terminal de estas proteínas, lo cual regula su actividad negativamente. La fosforilación de la p60<sup>src</sup> y de la p59<sup>fyn</sup> en esta región se lleva a cabo por una tirosina cinasa reguladora (Csk) cuya función es crucial para la inhibición de la actividad catalítica de estas proteínas (Cooper y Howell, 1993). La fosforilación de la p60<sup>src</sup> y la p59<sup>fyn</sup> por la Csk provoca la interacción de esta secuencia con su propio dominio SH2, hecho este que ocasiona un plegamiento de la molécula y su inactivación. Experimentos in vitro han demostrado que la proteína cinasa p60<sup>src</sup> puede activarse por incubación con un péptido sintético fosforilado, el cual puede desplazar la secuencia reguladora (la que se fosforila) del lugar de unión en el dominio SH2. Presumiblemente el dominio SH2 tiene más afinidad por la unión a este tipo de péptidos que a su propia secuencia reguladora (Liu y cols, 1993). Este hecho ha llevado a especular que la fosforilación de la tirosina 397 de la FAK puede crear un lugar de alta afinidad para la unión de las proteínas p60<sup>src</sup> y p59<sup>fyn</sup>, y que estas proteínas podrían unirse a la FAK, desplazando la secuencia reguladora de las mismas. Esta unión de la FAK con la p60<sup>src</sup> y la p59<sup>fyn</sup> podría ser el mecanismo por el cual estas proteínas son activadas, así como un mecanismo para fijar dichas proteínas en un lugar muy concreto de la célula (Parsons y cols, 1994).

Las consecuencias de la activación de la FAK, la p60<sup>src</sup> y la p59<sup>fyn</sup> tampoco están muy claras. El incremento en la fosforilación en restos de tirosina de la paxilina y la tensina, dependiente de la adhesión de las integrinas, tras activación de la FAK, hacen pensar que estas proteínas localizadas en las placas de adhesión focal son sustratos directos de la FAK o del complejo FAK-p60<sup>src</sup>/p59<sup>fyn</sup> (Otey, 1996).

Es muy posible que la activación de la FAK y de las p60<sup>src</sup>/p59<sup>fyn</sup> sea necesaria para catalizar el ensamblaje de las placas de adhesión focal, iniciando señales que podrían activar

otras vías de acoplamiento estímulo-respuesta en la célula. En este contexto es importante el papel de la FAK incorporando la paxilina a las placas de adhesión focal (Parsons y cols, 1994).

Grant y cols. (1995) han comprobado que la FAK está regulada específicamente por la p59<sup>fyn</sup> en el cerebro, ya que la mutación de esta proteína produce una hipofosforilación de la FAK. Este fenómeno no se observa cuando la mutación ocurrió en la p60<sup>src</sup> u otras tirosinas cinasas. El papel de la p59<sup>fyn</sup> en la regulación de la FAK es muy importante para la transmisión de señales intracelulares en la neurona. Como se ha comentado anteriormente las proteínas de la familia Src producen la fosforilación de la FAK en los residuos Tyr<sup>407</sup>, Tyr<sup>576</sup> y Tyr<sup>577</sup>. La ausencia de la p59<sup>fyn</sup> reduce la fosforilación de la FAK en los residuos Tyr<sup>576</sup> y Tyr<sup>577</sup>, lo cual disminuye su actividad (Grant y cols., 1995).

La activación de las proteínas FAK y las p60<sup>src</sup> y p59<sup>fyn</sup> podría ser suficiente para provocar la expresión de determinados genes o para activar otras rutas intracelulares (Damsky y Werb, 1992). Cuales son estas rutas y como se lleva a cabo este fenómeno todavía es una incógnita sin despejar.

#### ***SUSTRATOS Y PROTEÍNAS CON LAS QUE ESTÁ RELACIONADA LA FAK***

Dos de las proteínas que se ha demostrado son sustrato de la FAK son la paxilina (que se estudiará con mayor atención en el apartado siguiente) y la p130<sup>cas</sup> (Otey, 1996).

Existen muchas evidencias que indican que la paxilina es un sustrato de la FAK. En primer lugar, la paxilina y la FAK se fosforilan en residuos de tirosina tras la ocupación de las integrinas por elementos de la matriz extracelular (Burrige y cols., 1992) o cuando las células son estimuladas con agentes como la bombesina, el ácido lisofosfatídico, el PDGF o la CCK-8 (Zachary y Rozengurt, 1992; Seufferlein y cols., 1996). La fosforilación simultánea de la paxilina y la FAK en residuos de tirosina en respuesta a los múltiples estímulos citados con anterioridad sugiere que la fosforilación de la paxilina está íntimamente relacionada con la actividad de la FAK, concretamente, se han identificado los residuos de tirosina 31 y 118 (Tyr<sup>31</sup> y Tyr<sup>118</sup>) como los principales residuos fosforilados por la FAK *in vitro* (Bellis y cols., 1995; Schallery Parsons, 1995). No obstante, la fosforilación de los residuos Tyr<sup>31</sup> y Tyr<sup>118</sup> de la molécula de paxilina no es esencial para su localización en las placas de adhesión focal (Bellis y cols., 1995). Como se describió con anterioridad el extremo carboxilo-terminal de la FAK está relacionado con su localización en las placas de adhesión así como con la unión a la paxilina (Parsons y cols, 1994), recientemente se ha descrito que existe un sitio de unión específico para la paxilina localizado entre los residuos 919 y 1042, en el extremo carboxilo-terminal

(Tachibana y cols., 1995). La unión de la FAK a la paxilina es necesaria para la localización de la FAK en las placas de adhesión focal y para posibilitar su unión a las integrinas (Tachibana y cols., 1995), igualmente, la paxilina sirve como un adaptador que podría regular la formación de complejos proteicos tras su fosforilación en residuos de tirosina por la gran cantidad de dominios que permiten la unión proteína-proteína (Schaller y Parsons, 1995; Brown y Turner, 1997), la paxilina será estudiada en profundidad en el siguiente apartado.

Por último, se ha comprobado que la p130<sup>cas</sup> también es un sustrato de la FAK. La p130<sup>cas</sup>, fue inicialmente identificada como una proteína de 130KDa con altas tasas de fosforilación en residuos de tirosina en células que tienen sobreexpresión de p47<sup>v-Crk</sup> y p60<sup>v-Src</sup> (Sakai y cols., 1994). Esto sugirió que esta proteína desempeña un importante papel en la transformación celular mediada por los oncogenes v-Crk y v-Src. La p130<sup>cas</sup> posee un único dominio SH3 y múltiples residuos de tirosina cuya fosforilación daría lugar a la aparición de lugares de alta afinidad para dominios SH2; por esta razón se cree que esta proteína tiene un importante papel amplificando y propagando las señales iniciadas tras la activación de las integrinas (Hamasaki y cols., 1996; Harte y cols., 1996). La p130<sup>cas</sup> se une directamente tanto *in vivo* como *in vitro* con la FAK y con la FRNK (El dominio SH3 de la p130<sup>cas</sup> se une a la región rica en prolina localizada en el extremo carboxilo-terminal de la FAK y en la FRNK (Polte y Hanks, 1995; Harte y cols., 1996). La activación de las integrinas produce fosforilación de la p130<sup>cas</sup>, que participa en la cascada de señales iniciada por las integrinas (Harte y cols., 1996).

Otras proteínas con las que está asociada la FAK son los miembros de la familia de tirosinas cinasas Src, que se estudiaron anteriormente (Otey, 1996). También se relaciona la FAK con la p21<sup>ras</sup> por medio de un pequeño adaptador proteico, la proteína Grb2.

Recientemente Chen y cols. (1994) han descrito que la ocupación de las integrinas, que habíamos comentado en apartados anteriores produce fosforilación de la FAK (Akiyama y cols., 1994; Parsons y cols., 1994; Otey, 1996), causa la activación de la cascada de las MAP cinasas, sin embargo, no estudiaron la posible relación entre ambos procesos (Chen y cols., 1994). Por otro lado, Seufferlein y cols. (1996) han demostrado en células Swiss 3T3 que la activación de las MAP cinasas en respuesta a bombesina, ácido lisofosfatídico y PDGF no está relacionada con la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK (Seufferlein y cols., 1996).

### ***FUNCIONES DE LA FAK EN LA FISIOLOGÍA CELULAR***

Actualmente, se sabe realmente poco acerca de las funciones de la FAK en la fisiología celular. No se ha podido establecer una función clara y determinada para esta proteína, únicamente se ha demostrado su participación en mecanismos concretos en aquellas células donde se ha estudiado.

Este es el caso de los osteocitos, células donde la activación de la reabsorción osteoclástica produce la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK (Tanaka y cols., 1995). En monocitos humanos se ha demostrado la asociación de la FAK con la dinamina, una GTPasa de 100 KDa relacionada con la transmisión sináptica, la endocitosis y la internalización de los receptores. La dinamina posee una actividad GTPasa intrínseca que es estimulada por la unión de los microtúbulos a su extremo carboxilterminal o por la asociación con la FAK (Kharbanda y cols., 1995).

En las plaquetas, se expresa un único receptor para las inmunoglobulinas, el Fc $\gamma$ RII. Este receptor lleva a cabo múltiples respuestas celulares al interactuar con distintos complejos inmunes. La ocupación del receptor Fc $\gamma$ RII de las plaquetas por las IgGs también induce la fosforilación de distintas proteínas en residuos de tirosina (Haimovich y cols., 1996). Entre estas proteínas se encuentra la FAK y la p72<sup>syk</sup>. La fosforilación de estas proteínas también se produce en plaquetas unidas a las IgG que son deficientes en las integrinas, lo que demuestra que la ocupación del receptor Fc $\gamma$ RII provoca la fosforilación de la FAK en residuos de tirosina por una vía independiente de las integrinas (Haimovich y cols., 1996).

El papel de la FAK se ha relacionado siempre con la formación de las placas de adhesión focal y fibras de tensión en células en cultivo iniciada por la activación de las integrinas (Schwartz, 1992), sin embargo, existen datos contradictorios al respecto. En células REF52, la inhibición de la actividad de la FAK, mediante el inhibidor de las tirosinas cinasas herbimicina A, produce disminución de la creación de dicha placas de adhesión focal y consiguientemente disminuye la capacidad de extensión y movilidad celular (Burrige y cols., 1992). Sin embargo en algunos modelos celulares, como las células musculares de aorta de ratón, la FAK no es responsable de la formación de las placas de adhesión focal ni de las fibras de tensión (Wilson y cols., 1995). Es posible que en este modelo celular la función de la FAK sea diferente a la descrita en fibroblastos y células epiteliales, donde la FAK participa activamente en la constitución y ensamblaje de las placas de adhesión focal (Otey, 1996). Este hecho está firmemente apoyado por los estudios realizados por Defilippi y cols (1995) tratando células epiteliales con dos inhibidores diferentes de las fosfatasa (vanadato y óxido de

fenilarsina). La morfología de las células tratadas con estos inhibidores, así como el número de adhesiones celulares y su distribución más homogénea indican que el incremento en la fosforilación de la FAK incrementa el número de placas de adhesión focal en estas células. Por el contrario, estudios realizados con fibroblastos obtenidos de embriones de ratón de 8 días deficientes en FAK han puesto de manifiesto que la función de la FAK en la constitución de las placas de adhesión está más orientada hacia la reorganización de dichas placas que hacia su formación (Ilic y cols., 1995). Esto podría explicar la presencia en las células deficientes en FAK de un número de placas de adhesión muy superior a las presentes en células normales, fenómeno que da como resultado la reducción de la migración de estas células porque se fijan más al sustrato y a alteraciones en su morfología, las células son más redondeadas y su citoplasma presenta menos extensiones que las células normales (Ilic y cols., 1995). La formación de fibras de tensión de actina también se altera en las células deficientes en FAK, ya que si bien hay formación de fibras de tensión, su localización alrededor de la periferia celular en lugar de en la región central de la célula hace suponer que la FAK participa en la regulación de su organización, así mismo, la deficiencia en FAK da lugar a una distribución subcortical difusa de la cortactina, una proteína que se une a la actina, fenómeno que indica la desorganización del citoesqueleto de la región cortical (Ilic y cols., 1995).

También se ha sugerido que la FAK juega un papel importante en el crecimiento celular dependiente del anclaje (algunas células no pueden dividirse si no se fijan a un sustrato) (Ruoslahti y Reed, 1994). Aquellas células que necesitan estar unidas a un sustrato para dividirse comienzan a sufrir un fenómeno de muerte celular controlada, apoptosis, si se encuentran en suspensión. La FAK podría participar en la prevención de la aparición de apoptosis (Ruoslahti y Reed, 1994).

La FAK es esencial en la fisiología de las células embrionarias, ya que su falta en este tipo de células es letal (Schaller, 1996). También se ha relacionado la FAK con la extensión de la célula en la matriz extracelular (Burrige y cols., 1992) y con la motilidad celular. Así, el PDGF estimula la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK al tiempo que la quimiotaxis (Abedi y cols., 1995) y, recientemente, se ha demostrado que la FAK es esencial para la movilidad de las células endoteliales umbilicales humanas (Schaller, 1996). Además, en fibroblastos deficientes en FAK se ha observado una motilidad retardada debida a una mayor adhesión de las células al sustrato (Ilic y cols., 1995). Todas estas observaciones implican a la FAK en los procesos celulares de la migración y la extensión (Schaller, 1996).

En células patológicas, como las células transformadas por el virus del Sarcoma de Rous, se ha observado que la FAK es la mediadora de muchos de los efectos de esta



transformación al estar muy relacionada con la p60<sup>src</sup> (Schaller, 1996). En aquellos tumores en los que se modifica la expresión de la integrinas en la superficie celular, también se modifican las características carcinogénicas y metastásicas de la célula tumoral, fenómeno este que podría deberse a la acción de la FAK en estas células (Schaller, 1996). También la FAK podría estar involucrada en otras patologías, como la hiperproliferación y migración de células musculares vasculares (Schaller, 1996).

No existen datos que indiquen la participación de la FAK en los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción en células esencialmente secretoras, como es el caso de las células acinares pancreáticas. Se ha descrito una regulación de la FAK por agentes como el carbacol, la CCK-8 o la bombesina (potentes estimulantes de la secreción); sin embargo, su posible papel en la secreción celular aún no ha sido estudiado.

### 3.1.3. LA PAXILINA

La labor continuada de muchos investigadores en el campo de la adhesión celular, ha conducido, y continua haciéndolo hoy en día, a la identificación de un gran número de proteínas relacionadas con las placas de adhesión focal. En muchas ocasiones estas proteínas pertenecen al citoesqueleto, como es el caso de la zyxina (Sadler y cols, 1992) o la tensina (Wilkins y cols., 1986); en otras ocasiones se trata de proteínas reguladoras de la organización-desorganización de las placas de adhesión focal, incluyendo en este grupo a la proteína p60<sup>src</sup>, la serina treonina cinasa proteína cinasa C, y la calpaina, una proteasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Lee y Villereal, 1996).

Una de estas proteínas identificadas es la paxilina. Su caracterización inicial se llevó a cabo a finales de la década de los ochenta, tras el desarrollo y empleo de una serie de anticuerpos monoclonales, generados contra proteínas que presentasen residuos de tirosina fosforilados, en células transformadas por el virus del Sarcoma de Rous (Glenney y Zokas, 1989).

La paxilina es una proteína componente del citoesqueleto que se localiza en el extremo de las fibras de tensión de actina en las placas de adhesión focal. Esta proteína, de 68 KDa de peso molecular, fue purificada de músculo liso de pollo, y en vista de su localización se propuso la denominación de paxilina que viene del latín "*paxillus*". Esta denominación quería expresar la idea de que la paxilina actuaría a modo de "poste" donde los filamentos de actina se unirían (Turner y cols, 1990). Durante el proceso de purificación también se originaron a menudo dos

bandas inmunoreactivas de 43 y 41 KDa; sin embargo, se cree que son el resultado de la degradación proteolítica (Turner y cols, 1990).

La distribución de la paxilina en los diferentes tejidos es muy similar a la de la mayoría de las proteínas asociadas a las placas de adhesión focal. Es más abundante en el tejido muscular; así, en el músculo liso es donde se han observado los niveles más altos de paxilina (Turner, 1994). De igual modo está presente, aunque a menores concentraciones, en el músculo esquelético y cardíaco (Turner, 1994). Hasta la fecha no se ha detectado su presencia en tejido neuronal ni en plaquetas. El hecho de que no aparezca en el tejido nervioso coincide con la baja expresión en este tejido de otras proteínas relacionadas con las placas de adhesión focal, como la talina y la vinculina (Drenckhahn y cols, 1988). Sin embargo, es sorprendente la ausencia de paxilina en las plaquetas dado que muchas de las propiedades de las mismas derivan de sus placas de adhesión focal, y también porque contienen excepcionalmente altos niveles de otras proteínas relacionadas con las adhesiones focales, como la talina, la vinculina y las integrinas (Turner, 1994).

Como se comentó en el apartado anterior, la paxilina es un sustrato de la FAK, que fosforila a la paxilina en los residuos de tirosina 31 y 118 (Bellis y cols., 1995; Schaller y Parsons, 1995); sin embargo, recientemente se ha descrito que la paxilina es predominantemente fosforilada en residuos de serina en respuesta a la adhesión celular a la matriz extracelular (De Nichilo y Yamada, 1996), la proteína cinasa responsable de esta fosforilación así como el efecto que este fenómeno tiene sobre la actividad de la paxilina todavía se desconoce (Brown y Turner, 1997).

La paxilina es un componente muy importante de las placas de adhesión focal, ya que facilita la formación de complejos proteicos que participan en diferentes vías intracelulares (Brown y Turner, 1997). La gran capacidad de la paxilina para unirse a numerosas proteínas se debe a su estructura proteica. La secuencia de aminoácidos de la paxilina revela una gran cantidad de secuencias que favorecen la unión proteína-proteína, entre ellos, dominios SH2 y SH3, además de esto cuenta con cuatro dominios LIM (los dominios LIM son secuencias de aproximadamente 50 aminoácidos ricas en cisteína e histidina que quelan dos moléculas de zinc, constituyendo unas formaciones a modo de dedos, que actúan como intermediarios en la relación proteína-proteína) y de otras secuencias de aminoácidos denominadas LD, cuya función es la unión a la FAK, la vinculina y quizás otras proteínas aún no identificadas (Brown y cols., 1996; Brown y Turner, 1997). Además de unirse a la vinculina y a la FAK, la paxilina se une por medio del dominio SH2 con las proteínas Crk, Csk y Lyn y por el dominio SH3 se une a la

Src (Clark y Brudge, 1995). Por esta razón se cree que la paxilina tiene un papel de pivote en las placas de adhesión focal diversificando la respuesta iniciada por la activación de las integrinas.

Con la realización de experimentos empleando paxilina marcada radiactivamente (con <sup>125</sup>I) se pudo demostrar la unión de la paxilina y la vinculina. Sin embargo no se une a otros componentes de las placas de adhesión focal como la talina, ni a la  $\alpha$ -actinina, ni a la actina (Turner y cols, 1990). La vinculina, es una molécula que se compone de dos dominios estructuralmente distintos. Estos dominios consisten en una cabeza globular y una cola alargada (Milam, 1985). La vinculina se puede dividir en estos dos dominios utilizando la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*, técnica que ha servido para conocer el sitio de unión de la paxilina a la molécula de vinculina. El sitio de unión específico de la paxilina a la vinculina se localiza en la cola alargada de la molécula (Turner y cols, 1990), mientras que en la cabeza se localiza el sitio específico de unión para la talina (Jones y cols, 1989). La paxilina podría servir para localizar la vinculina en las placas de adhesión focal (Turner, 1994). La otra proteína a la que se encuentra unida la paxilina es la FAK. La colocalización de la paxilina y la FAK en las placas de adhesión focal y el hecho de que ambas proteínas se fosforilen en restos de tirosina al mismo tiempo durante la adhesión celular, sugirió en un primer momento que la paxilina podría estar unida directamente a la FAK (Turner, 1994). Posteriormente se identificó el sitio concreto de unión de la paxilina a la molécula de la FAK, como se citó en el apartado correspondiente a la FAK, en el extremo carboxilo terminal de esta proteína existe una secuencia, entre los aminoácidos 919 y 1042, a la cual la paxilina podría unirse eficazmente, (Parsons y cols, 1994; Tachibana y cols., 1995).

Recientemente, se ha estudiado la molécula de paxilina para conocer la secuencia responsable de su localización en las placas de adhesión focal. Como se mencionó con anterioridad ni los lugares de fosforilación de la FAK, residuos de tirosina 31 y 118, ni los dominios LD son esenciales para localizar la paxilina en las placas de adhesión (Bellis y cols., 1995; Schaller y Parsons, 1995). Recientemente, se ha descrito que los dominios LIM son los responsables de la localización de la paxilina en las placas de adhesión focal (Brown y cols., 1996; Brown y Turner, 1997).

La fosforilación de la paxilina y la FAK en restos de tirosina iniciada por la adhesión celular va siempre acompañada de la formación de fibras de tensión de actina (BurrIDGE y cols, 1992). Estos dos hechos se presentan como dos eventos estrechamente acoplados; así, experimentos realizados pretratando las células con herbimicina, un inhibidor de la actividad tirosina cinasa, previamente a la unión de dichas células, inhibió la fosforilación en restos de

tirosina tanto de la FAK como de la paxilina, e impidió la formación de fibras de tensión de actina (BurrIDGE y cols, 1992).

Hasta la fecha todo son especulaciones acerca de como la fosforilación de estas dos proteínas en restos de tirosina está relacionada con la formación de las placas de adhesión. Una posibilidad sería que la fosforilación en restos de tirosina de la paxilina permitiría a esta proteína "reclutar", en torno a los lugares de adhesión, proteínas que poseen dominios SH2 (con afinidad para unirse a residuos de tirosina fosforilados) (Pawson y Gish, 1992), como la tensina, que una vez localizada en estas zonas podría crear un centro de nucleación para la polimerización de las moléculas de actina y consiguientemente la formación de fibras de tensión (Turner, 1994).

La fosforilación de restos de tirosina de la FAK y la paxilina es necesaria para la formación de las placas de adhesión focal y la organización de las fibras de tensión (Schaller y cols., 1992). Sin embargo, por si solo este hecho no es suficiente para lograrlo, como lo demuestran los trabajos publicados por algunos autores (BurrIDGE y cols, 1992; Woods y cols, 1986); esto sugiere que otros factores, por ejemplo la activación de la proteína cinasa C (Woods y Couchman, 1992) podrían contribuir al normal ensamblaje de los elementos del citoesqueleto.

Las interacciones entre las células y la matriz extracelular son muy importantes cuando se lleva a cabo el desarrollo embrionario. Aunque cierta actividad tirosina cinasa observada en estas células es debida a las cinasas unidas a receptores de los factores de crecimiento (como el PDGF o el EGF) el perfil de proteínas fosforiladas en restos de tirosina es muy similar al observado en fibroblastos tras su adhesión a la matriz extracelular (Turner y cols, 1993). De hecho, la paxilina y la FAK son las dos proteínas que más se fosforilan durante el desarrollo embrionario de los diferentes tejidos (Turner y cols, 1993). Otras proteínas relacionadas con las placas de adhesión focal, como la vinculina, no son fosforiladas en restos de tirosina durante el desarrollo embrionario (Maher y Pasquale, 1988).

Teniendo en cuenta la información existente sobre los aspectos de la fisiología celular en los que participan las proteínas tirosinas cinasas y en particular la proteína cinasa FAK y la paxilina planteamos el trabajo presentado en el presente capítulo con los siguientes OBJETIVOS:

1. Determinar si la ocupación de receptores acoplados a proteínas G de membrana, que activan principalmente la PLC, induce la fosforilación en residuos de tirosina de la tirosina cinasa FAK y de la proteína del citoesqueleto paxilina en células acinares pancreáticas, y de ser

así, identificar la implicación de la activación de la PKC y de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en este proceso.

2. Determinar si la ocupación de receptores en células acinares pancreáticas acoplados a proteínas G de membrana, que activan la adenilato ciclasa, induce la fosforilación en residuos de tirosina de la tirosina cinasa FAK y su sustrato paxilina, y de ser así, estudiar la posible implicación de los incrementos en AMPc en este proceso.

## **3.2. METODOLOGÍA**

### **3.2.1 ANIMALES Y PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS**

El tipo de animales, su manejo y preparación previa a la realización de los experimentos, y la técnica empleada para obtener la suspensión acinar se describen en el capítulo II, "Metodología general", apartados 2 y 3 respectivamente.

### **3.2.2 DETERMINACION DE LA FOSFORILACIÓN DE LA FAK Y LA PAXILINA EN RESIDUOS DE TIROSINA**

El método empleado para determinar la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es el Western Blotting, que se describió en el capítulo II. En este bloque de experimentos el protocolo seguido fue el indicado en el apartado mencionado, con la única salvedad de la realización de un inmunoblotting específico para las proteínas objeto de estudio. El inmunoblotting se realizó incubando las membranas con el anticuerpo específico para proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, PY20 y los anticuerpos específicos para las proteínas objeto de estudio, FAK y paxilina. Estos anticuerpos se diluyen en la misma solución con la que se bloqueó previamente la membrana (solución de bloqueo) (ver capítulo II).

PY20 es un anticuerpo monoclonal de ratón, isotipo IgG2b, que se une específicamente a residuos de tirosina fosforilados. El anticuerpo se diluye en solución de bloqueo en una proporción 1:1000. La incubación de las membranas con este anticuerpo se llevó a cabo durante un periodo de cinco horas, a temperatura ambiente con agitación constante. Con este protocolo experimental se pretende estudiar el conjunto de proteínas que se fosforilan en restos de tirosina con el tratamiento estudiado.

Para la FAK se emplea un anticuerpo monoclonal de ratón, isotipo IgG1, a la dilución 1:1000. El anticuerpo anti-paxilina es también un anticuerpo monoclonal de ratón, isotipo IgG1, a la dilución 1:10000. La incubación con los anticuerpo anti-FAK y anti-paxilina se realizó a temperatura ambiente durante 2 horas y agitación constante. El resto de los pasos a seguir hasta la finalización del Western blotting son los indicados en el apartado correspondiente del capítulo II.

El tratamiento de las células acinares con tapsigargina, como bloqueante de la ATPasa que introduce  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplásmico, en un medio libre de calcio, para bloquear los

incrementos en la concentración de calcio intracelular, requirió una solución de incubación modificada (solución de incubación libre de calcio). La nueva composición es la siguiente:

*Composición de la solución de incubación libre de calcio*

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

El pH de esta solución se ajustó a 7,45 con NaOH 10N.

Los resultados se expresan como porcentaje del control (valor obtenido con el secretagogo estudiado), porcentaje del incremento máximo (obtenido con el secretagogo ensayado a la concentración que produce el efecto máximo) o como incremento neto (fosforilación de las proteínas estudiadas obtenida tras estimulación dividido por el correspondiente valor sin estimulación).

### **3.3. RESULTADOS**

#### **3.3.1 IDENTIFICACIÓN DE LA FAK Y LA PAXILINA UTILIZANDO ANTICUERPOS ESPECÍFICOS.**

El tratamiento de las células acinares pancreáticas con carbacol (10 $\mu$ M) o CCK-8 (10nM) provocó un marcado incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de al menos cinco proteínas con pesos moleculares superiores a 60 KDa, como puede apreciarse tras la inmunoprecipitación de los lisados de células acinares con el anticuerpo anti-tirosina fosforilada PY20 y posterior incubación de las membranas con el mismo tipo de anticuerpo (figura 1A). El peso molecular de estas proteínas, que se calculó empleando un estandar de proteínas de peso molecular conocido, fue de 145, 130, 126, 95 y 79 KDa.

Con objeto de investigar si la proteína FAK podría ser fosforilada en restos de tirosina por acción del carbacol o la CCK-8, los acinos pancreáticos fueron incubados durante 5 minutos con carbacol (10 $\mu$ M) y CCK-8 (10nM). Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo PY20 y posteriormente se realizó la incubación de las membranas con el anticuerpo específico anti-FAK (figura 1B). Como puede apreciarse en la figura 1B tanto el carbacol (calle 2) como la CCK-8 (calle 3) causan un notable incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de una única banda que co-migra con la banda de peso molecular 126 de la figura 1A.

A continuación estudiamos si la paxilina es una de las proteínas que aparecen en la banda de peso molecular 79KDa de la figura 1A. Los lisados celulares después de inmunoprecipitados con el anticuerpo PY20 se incubaron con el anticuerpo específico anti-paxilina. El carbacol (10 $\mu$ M) (calle 2) y la CCK-8 (10nM) (calle 3) estimulan la fosforilación en residuos de tirosina en una única banda de peso molecular entre 72 y 87 KDa (figura 1C). Esta banda co-migra con la banda de 79KDa descrita con el anticuerpo anti-tirosina fosforilada (figura 1A).



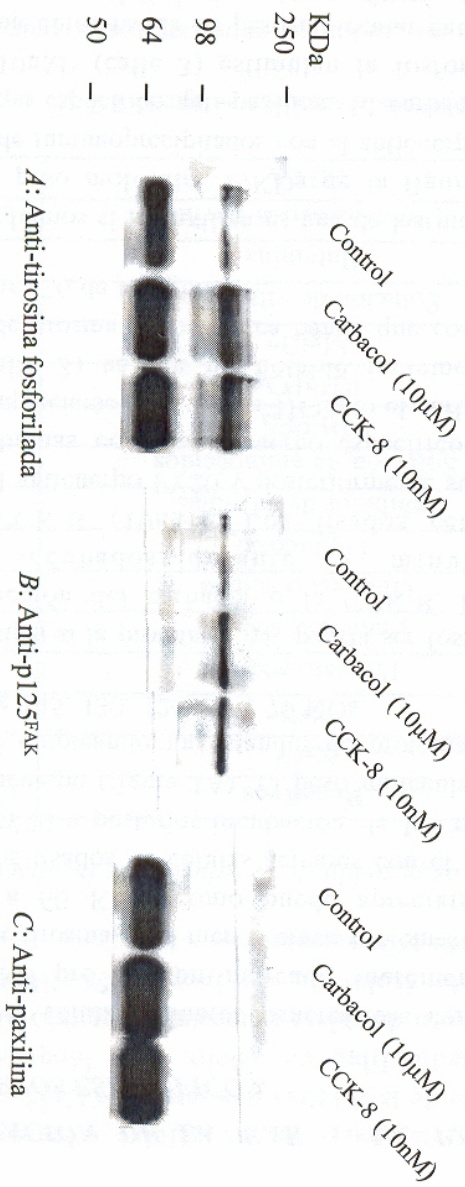


FIGURA 1. Fosforilación de proteínas de peso molecular superior a 60KDa en residuos de tirosina en células acinares de rata en respuesta a carbacol (10µM) y CCK-8 (10nM). *A*: las membranas se analizaron con el anticuerpo anti-tirosina fosforilada (PY20). *B*: las membranas se analizaron con el anticuerpo específico para p125<sup>FAK</sup>. *C*: las membranas se analizaron con el anticuerpo específico para la paxilina. Las líneas que se encuentran a la izquierda indican los pesos moleculares.

### **3.3.2. EFECTO DEL CARBACOL EN LA FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS DE TIROSINA DE LA FAK Y LA PAXILINA**

La ocupación de los receptores colinérgicos por el carbacol a la concentración 10 $\mu$ M produce la fosforilación de distintas proteínas en residuos de tirosina; entre estas proteínas, como se ha podido identificar por incubación con anticuerpos específicos, se encuentran la FAK y la paxilina (ver Figura 1).

La incubación de acinos pancreáticos con 10 $\mu$ M de carbacol provoca un rápido incremento en la fosforilación de FAK en residuos de tirosina. Esta respuesta alcanza el máximo a los 5 minutos. La respuesta a la estimulación del carbacol disminuye a partir de este momento de forma progresiva (figura 2).

Paralelamente, la estimulación con carbacol causó un incremento en la fosforilación de paxilina en residuos de tirosina. Dicho incremento alcanzó el máximo a los 5 minutos de estimulación. La respuesta disminuye tras 10 minutos de incubación con el agonista (figura 3).

Dado que el mayor incremento de fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina se obtuvo a los 5 minutos de incubación con carbacol, se consideró este tiempo como el óptimo, así, las incubaciones de los acinos pancreáticos con carbacol se llevaron a cabo durante 5 minutos.

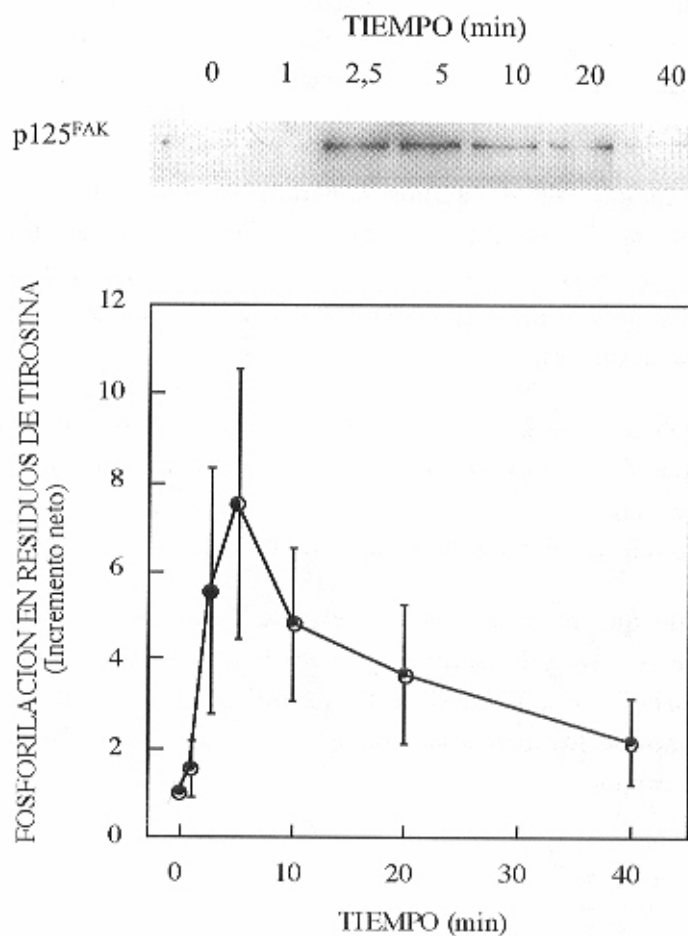


FIGURA 2. Efecto de la estimulación de acinos pancreáticos de rata con **carbacol** (10 $\mu$ M) en la fosforilación en residuos de tirosina de la **FAK**. Relación tiempo-incremento en la fosforilación en tirosina. Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media  $\pm$  EEM de los incrementos netos (n=5). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 4.

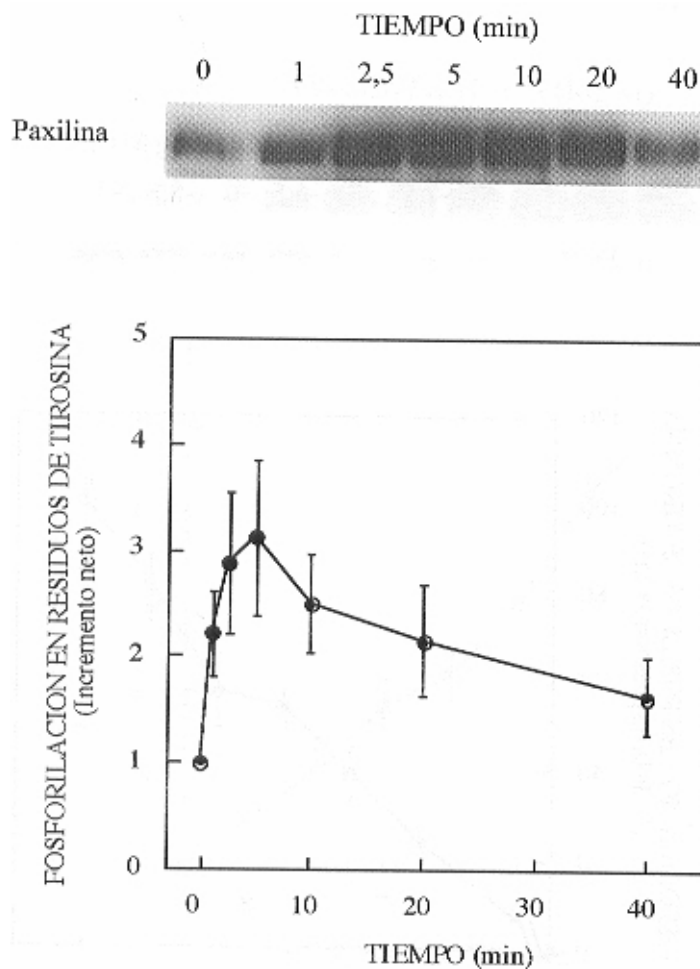


FIGURA 3. Efecto de la estimulación de acinos pancreáticos de rata con **carbacol** (10 $\mu$ M) en la fosforilación en residuos de tirosina de la **paxilina**. Relación tiempo-incremento en la fosforilación en tirosina. Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media  $\pm$  EEM de los incrementos netos (n=8). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 7.

El carbacol estimula la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina de un modo dependiente de la concentración, como se observa en las figuras 4 y 5. El efecto máximo se obtuvo para ambas proteínas a la concentración 10 $\mu$ M, con un incremento neto de 7,5  $\pm$  2,9 y 3,2  $\pm$  0,7 para la FAK y la paxilina, respectivamente. La EC50 fue de 1 $\mu$ M para ambas proteínas mencionadas.

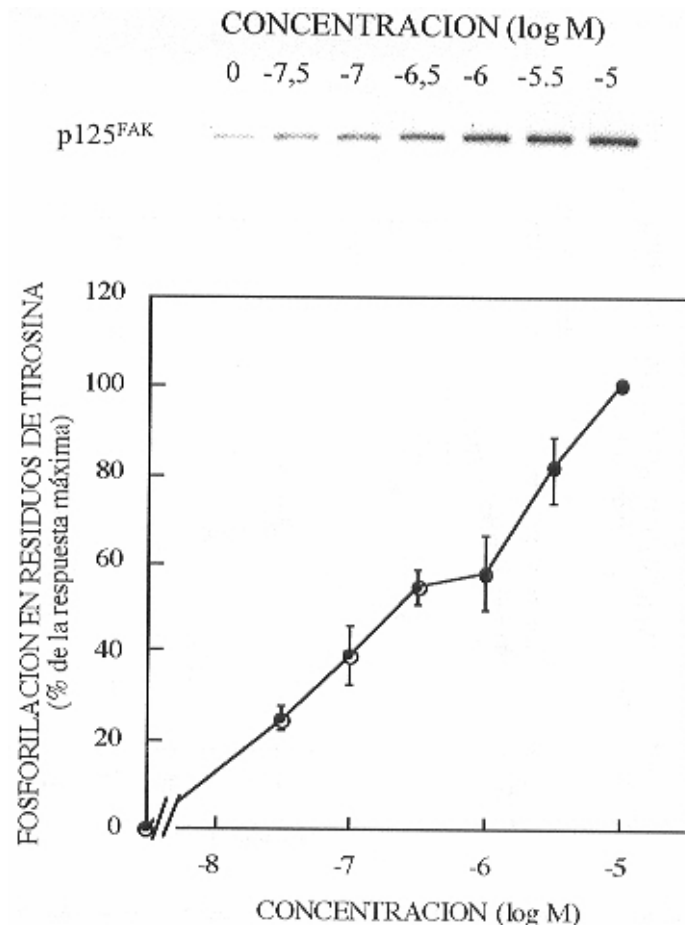


FIGURA 4. Curva concentración-efecto del **carbacol** para la fosforilación en residuos de tirosina de la **FAK** en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media  $\pm$  EEM de los incrementos netos (n=6). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 5.

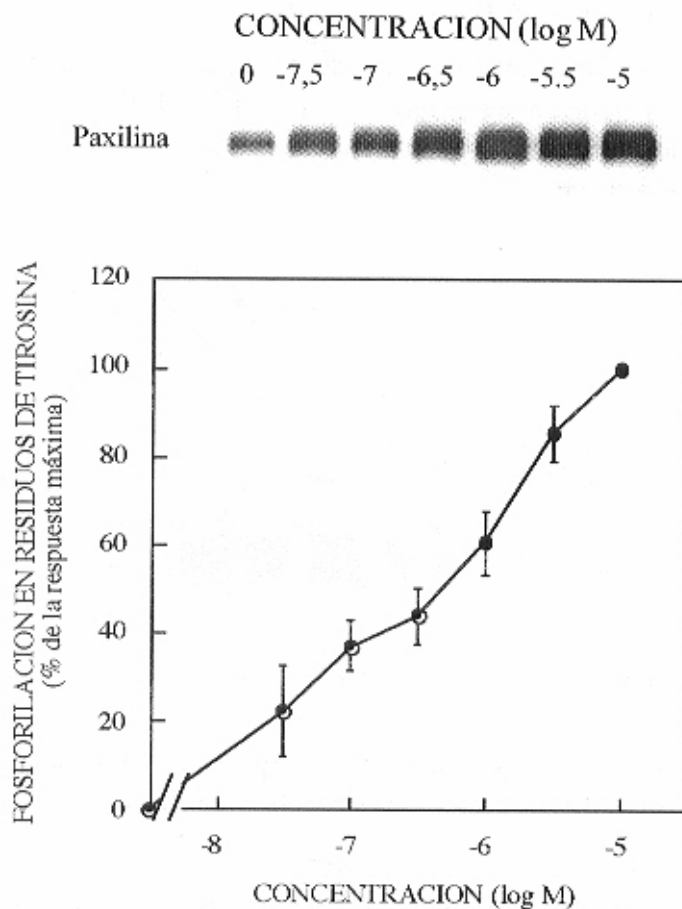


FIGURA 5. Curva concentración-efecto del **carbacol** para la fosforilación en residuos de tirosina de la **paxilina** en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media  $\pm$  EEM de los incrementos netos (n=8). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 7.

### 3.3.3. EFECTO DE LA CCK-8 EN LA FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS DE TIROSINA DE LA FAK Y LA PAXILINA

La estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 a la concentración 10nM produce un incremento en la fosforilación de varias proteínas en residuos de tirosina, entre estas proteínas se encuentran la FAK y la paxilina (Figura 1).

La figura 6 muestra el efecto de dos concentraciones de CCK-8, 10 y 0,1nM, y el agonista parcial de la CCK-8, JMV-180 (1 $\mu$ M) en la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina.

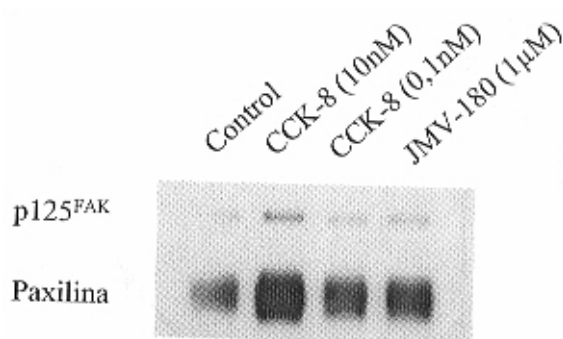


FIGURA 6. Fosforilación de FAK y paxilina en residuos de tirosina en respuesta a CCK-8 (0,1 y 10nM) y JMV-180 (1 $\mu$ M) en células acinares pancreáticas.

El efecto de la CCK-8 fue dependiente del tiempo de incubación. La figura 7 muestra la relación entre el incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y el tiempo de estimulación con CCK-8 (10nM) en acinos pancreáticos de rata.

Como puede observarse en la figura, un minuto después de la adición del péptido ya se detectó un incremento en la fosforilación de la FAK, alcanzando la respuesta máxima a los 2,5 minutos. Tras 5 minutos de estimulación la respuesta comienza a disminuir alcanzando a los 40 minutos valores próximos a basal.

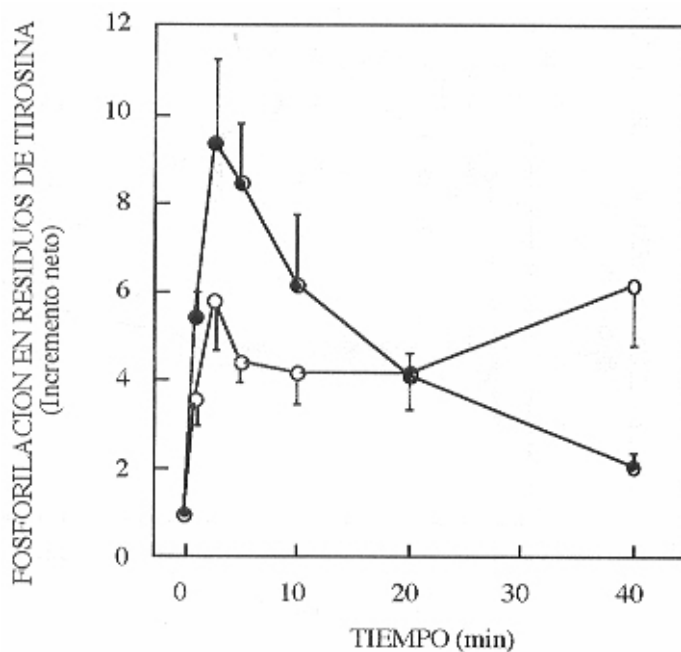


FIGURA 7. Efecto de la estimulación de acinos pancreáticos de rata con **CCK-8** (10nM) (círculos cerrados) y **JMV-180** (1 $\mu$ M) (círculos abiertos) en la fosforilación en residuos de tirosina de la **FAK**. Relación tiempo-incremento en la fosforilación en tirosina. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM de los incrementos netos (n=6).

Por otro lado, la CCK-8 provocó un rápido incremento en la fosforilación de paxilina en residuos de tirosina. Dicho incremento alcanzó el máximo a los 2,5 minutos. El incremento en fosforilación se mantuvo durante al menos 20 minutos y posteriormente decreció (figura 8).

Dado que los valores obtenidos a 2,5 y 5 minutos de incubación (tiempos a los que se obtiene la máxima respuesta) son muy similares, se empleó como tiempo de incubación 5 minutos, para estandarizar los tiempos de incubación de todos los secretagogos empleados a lo largo de la presente Tesis.



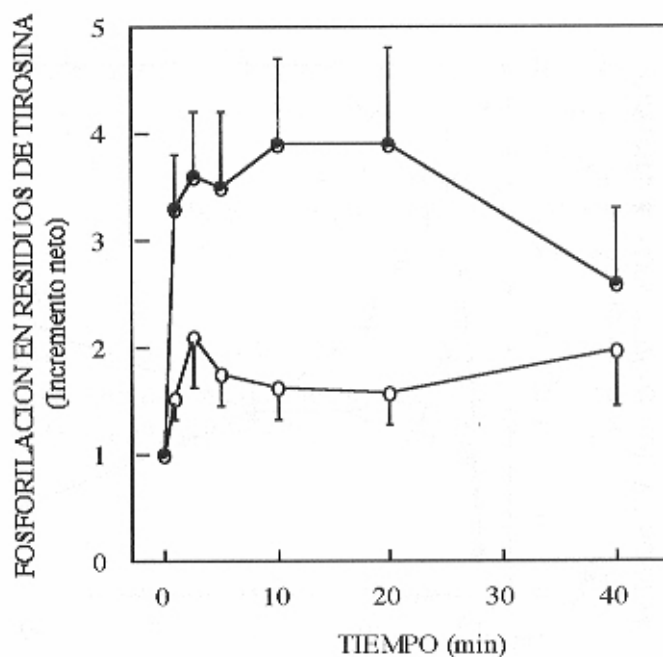


FIGURA 8. Efecto de la estimulación de acinos pancreáticos de rata con **CCK-8** (10nM) (círculos cerrados) y **JMV-180** (1 $\mu$ M) (círculos abiertos) en la fosforilación en residuos de tirosina de la **paxilina**. Relación tiempo-incremento en la fosforilación en tirosina. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM de los incrementos netos (n=5).

El efecto de la CCK-8 sobre la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina fue dependiente de la concentración. En las figuras 9 y 10 están representadas las curvas concentración-respuesta de fosforilación de la FAK y la paxilina para la CCK-8. Cuando estimulamos acinos pancreáticos de rata con CCK-8 durante 5 minutos a concentraciones entre 1pM y 100nM, la respuesta, representada frente al logaritmo de la concentración de CCK, no muestra un perfil bifásico, como ocurre con la secreción de amilasas estimulada por dicho péptido.

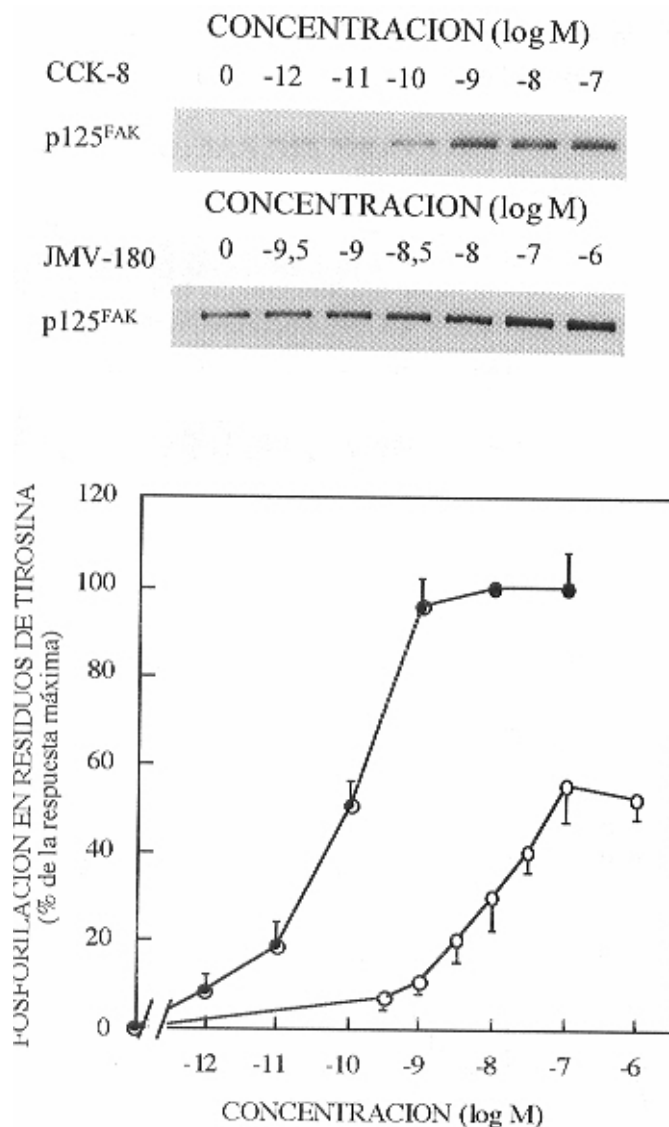


FIGURA 9. Curva concentración-efecto de la **CCK-8** (círculos cerrados) y el **JMV-180** (círculos abiertos) para la fosforilación en residuos de tirosina de la **FAK** en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media  $\pm$  EEM de los incrementos netos (n=4). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 3.

La CCK-8 provocó una respuesta máxima a la concentración 10nM con un incremento neto de  $8,4 \pm 1,4$  y  $3,5 \pm 0,7$  en la fosforilación de la FAK y de la paxilina, respectivamente, y una EC50 igual a 0,1nM para la FAK y 0,03nM para la paxilina.

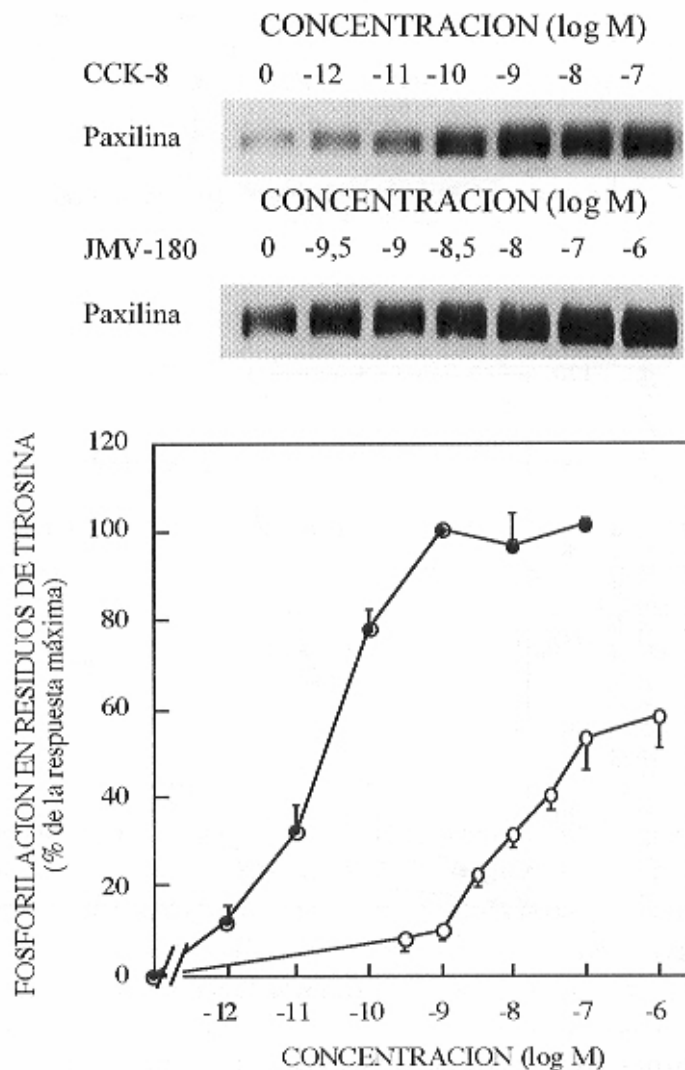


FIGURA 10. Curva concentración-efecto de la **CCK-8** (círculos cerrados) y el **JMV-180** (círculos abiertos) para la fosforilación en residuos de tirosina de la **paxilina** en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media  $\pm$  EEM de los incrementos netos (n=4). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 3.

El efecto máximo producido por el carbacol y la CCK-8 en ambas proteínas resultó ser muy similar, aunque es necesaria una concentración 1000 veces mayor de carbacol para conseguir el mismo efecto que con la CCK-8.

*Determinación del tipo de receptor implicado en la fosforilación de la FAK y de la paxilina en residuos de tirosina*

Con objeto de determinar si el efecto de la CCK-8 sobre la fosforilación de la FAK y sus sustratos en residuos de tirosina se debe a la ocupación de los receptores para la CCK de tipo A (CCK<sub>A</sub>) se estudió el efecto del antagonista específico del receptor CCK<sub>A</sub>, L-364,718.

El antagonista L-364,718 a la concentración 1μM no tuvo por sí mismo ningún efecto en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK ni de su sustrato, la paxilina (Figuras 11 y 12); sin embargo, inhibió completamente la fosforilación, en residuos de tirosina, de la FAK y la paxilina estimulada por CCK-8 (0,1 y 10nM) y JMV-180 (10nM y 1μM).

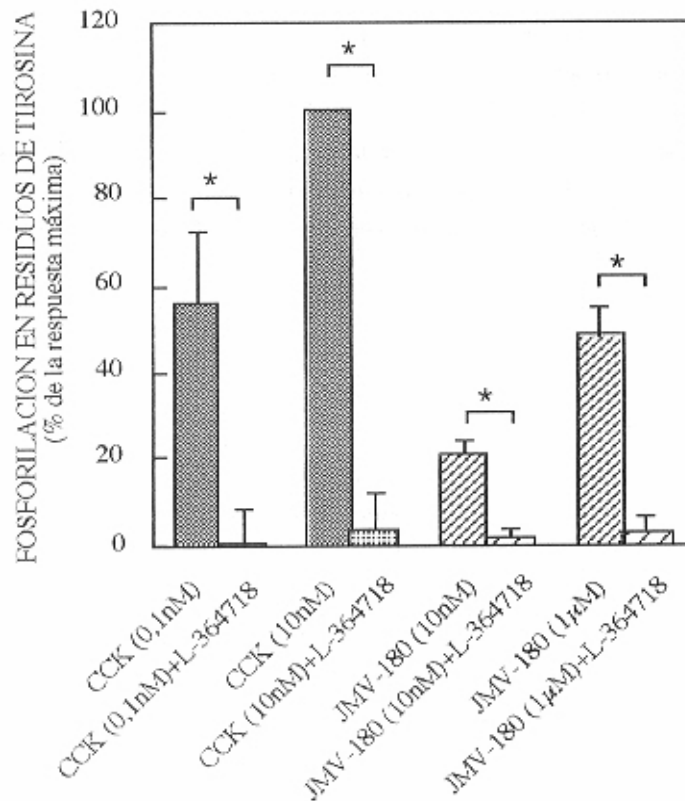
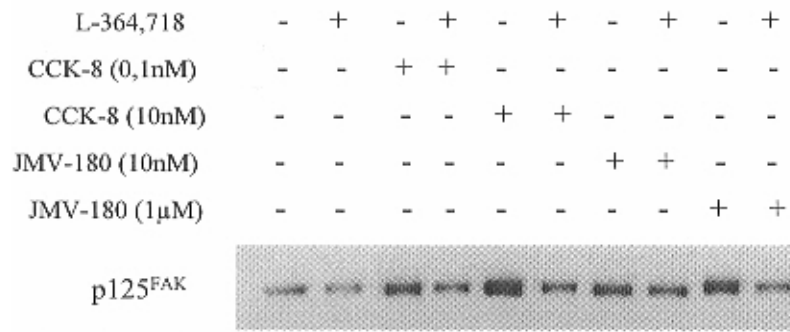


FIGURA 11. (página siguiente) Efecto del antagonista específico del receptor CCK<sub>A</sub>, **L-364718** (1µM), en la fosforilación en residuos de tirosina de la **FAK** estimulada por **CCK-8** (0,1 y 10nM) y **JMV-180** (10nM y 1µM), en acinos pancreáticos de rata. Los resultados se representan como la media ± EEM y se expresan como porcentaje del incremento máximo en fosforilación causado por CCK-8 (10nM) (n=4). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida por su respectivo control (p<0,05). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros tres del efecto del L-364,718 en la fosforilación en tirosina de la FAK en respuesta a CCK-8 y JMV-180.

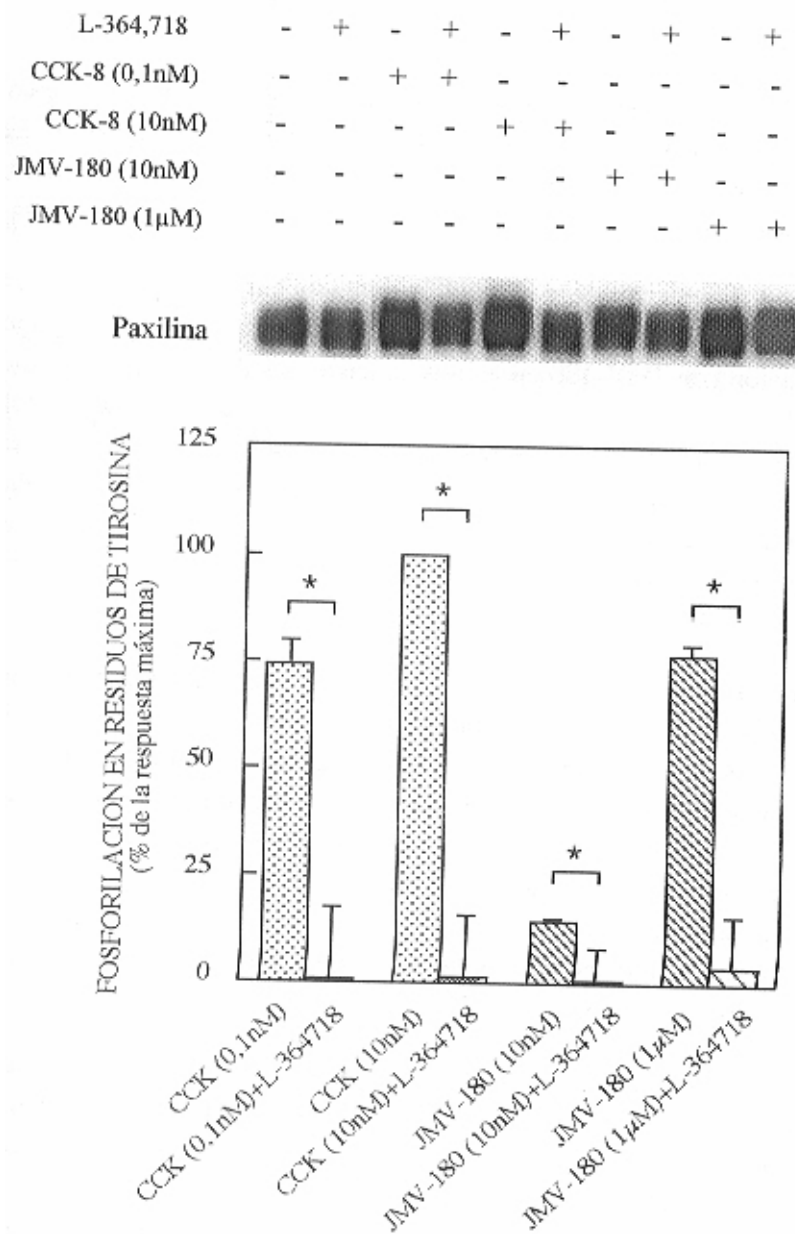


FIGURA 12. (página siguiente) Efecto del antagonista específico del receptor CCK<sub>A</sub>, **L-364718** (1µM), en la fosforilación en residuos de tirosina de la **paxilina** estimulada por **CCK-8** (0,1 y 10nM) y **JMV-180** (10nM y 1µM), en acinos pancreáticos de rata. Los resultados se representan como la media ± EEM y se expresan como porcentaje del incremento máximo en fosforilación causado por CCK-8 (10nM) (n=4). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida por su respectivo control (p<0,05). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros tres del efecto del L-364,718 en la fosforilación en tirosina de la paxilina en respuesta a CCK-8 y JMV-180.

Implicación de los estados de alta y baja afinidad del receptor CCK<sub>A</sub> en la fosforilación en tirosina de la FAK y la paxilina en acinos pancreáticos

El JMV-180, que en la rata actúa como un agonista del estado de alta afinidad del receptor CCK<sub>A</sub> y antagonista del estado de baja afinidad (Tsunoda y Owyang, 1993), a la concentración 1 μM provocó la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina (ver figura 6)

Las figuras 7 y 8 muestran la relación entre el incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina y el tiempo de estimulación con JMV-180 en acinos pancreáticos de rata. Tras la adición de JMV-180 se produce una rápida fosforilación de las proteínas mencionadas, así, 1 minuto después de la estimulación con JMV-180 ya se detecta un incremento. El incremento neto máximo se obtuvo tras 2,5 minutos de estimulación con el JMV-180 y se mantuvo durante al menos 40 minutos. Al igual que para la CCK-8, el tiempo de incubación elegido fue de 5 minutos.

Las figuras 9 y 10 muestran las curvas concentración-respuesta en fosforilación de la FAK y la paxilina para el JMV-180. Cuando estimulamos acinos pancreáticos de rata durante 5 minutos con JMV-180, a concentraciones comprendidas entre 0,3 nM y 1 μM, las respuestas fueron dependientes de la concentración. La EC<sub>50</sub> observada fue de 10 nM y el efecto máximo obtenido con la dosis más alta de JMV-180 empleada (1 μM) fue aproximadamente un 50% del inducido por la CCK-8 a dosis máximas, con incrementos netos de  $4,4 \pm 0,5$  y  $1,75 \pm 0,3$  para la FAK y la paxilina, respectivamente.

Como se puede observar en las curvas concentración-respuesta de fosforilación de FAK y paxilina estimulada por CCK-8 y JMV-180, la respuesta inducida por la dosis máxima de JMV-180 empleada fue significativamente inferior a la respuesta máxima observada cuando se estimuló con CCK-8 (aproximadamente el 50%). Dado que el JMV-180 es un agonista del estado de alta afinidad del receptor de la CCK-8 y la estimulación de este estado del receptor no consigue el efecto producido por la CCK-8, estudiamos si el estado de baja afinidad del receptor participa en la respuesta provocada por la CCK-8. El protocolo experimental se basó en el papel del JMV-180 como antagonista del estado de baja afinidad del receptor CCK<sub>A</sub> en la rata.

Los acinos pancreáticos se estimularon con JMV-180 (3 μM) o con CCK-8 (1 nM) o con CCK-8 (1 nM) en combinación con concentraciones crecientes de JMV-180 (0,1 μM, 1 μM y 3 μM). El efecto sobre la fosforilación de la FAK y la paxilina se representan en las figuras 13 y 14, respectivamente.

La inhibición de la respuesta inducida por la CCK-8 comenzó a ser significativa a partir de la concentración de JMV-180 (1µM) (p<0,05). La incubación de acinos pancreáticos con CCK-8 (1nM) y JMV-180 (3µM) reduce el incremento en la fosforilación de residuos de tirosina de ambas proteínas a valores similares a los observados tras la incubación con JMV-180 (3µM).

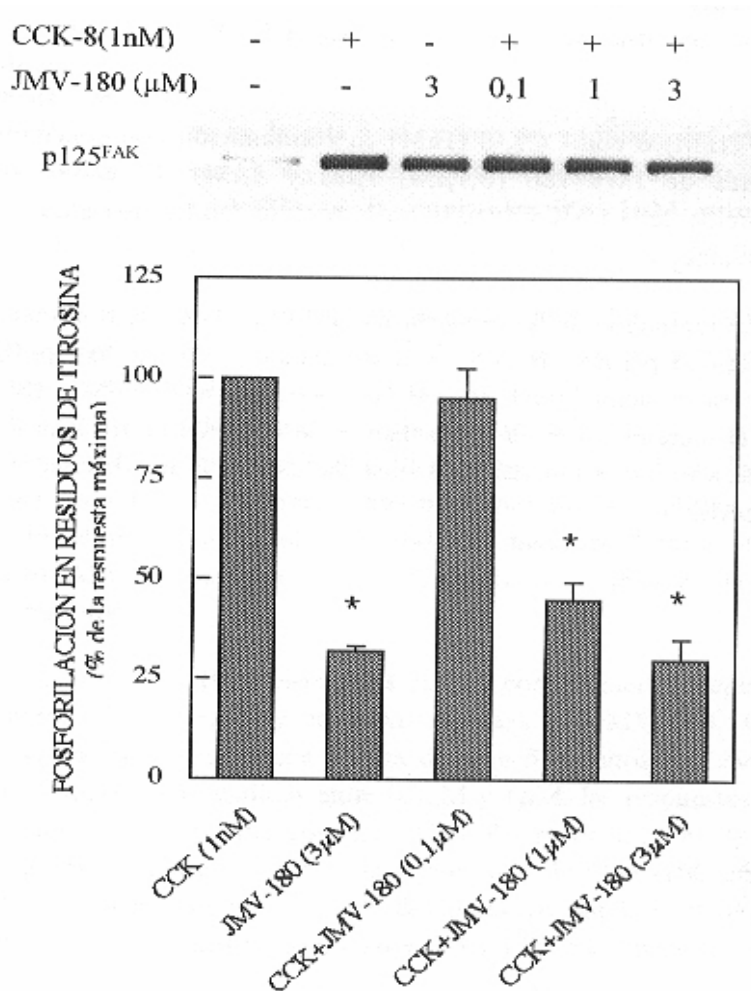


FIGURA 13. Efecto del agonista parcial de la CCK, JMV-180, sobre la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK estimulada por CCK-8 (1nM) en acinos pancreáticos de rata. Los resultados se representan como la media ± EEM y se expresan como porcentaje del incremento máximo en fosforilación causado por CCK-8 (1nM) (n=5). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida por CCK-8 (1nM) (p<0,05). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 4.



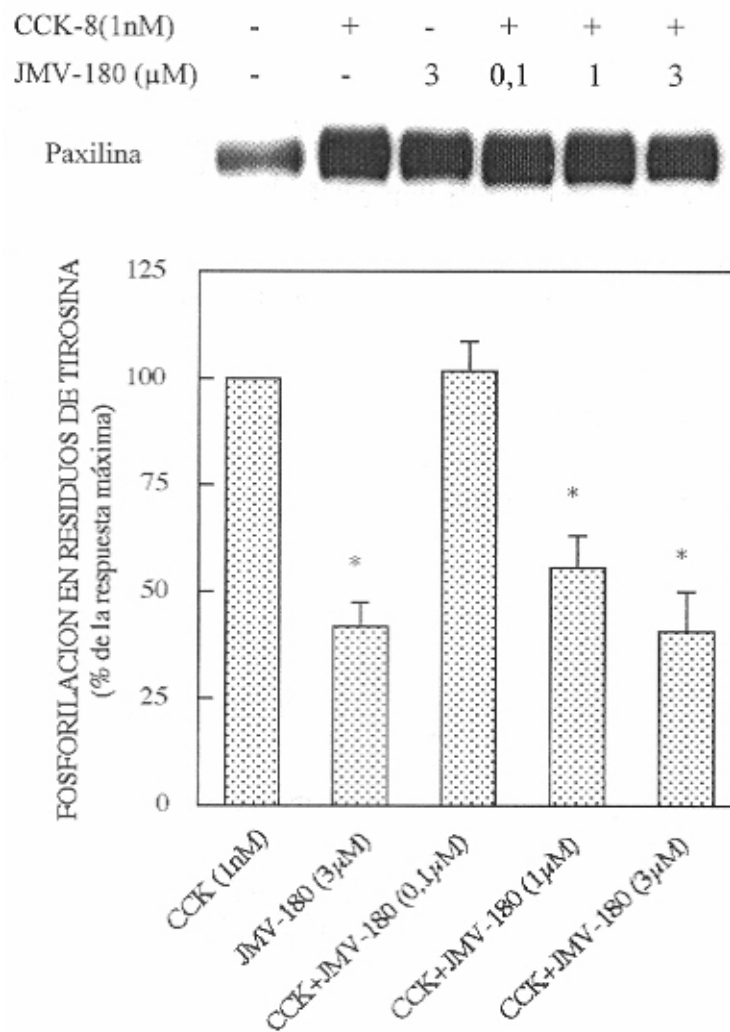


FIGURA 14. Efecto del agonista parcial de la CCK, JMV-180, sobre la fosforilación en residuos de tirosina de la **paxilina** estimulada por CCK-8 (1nM) en acinos pancreáticos de rata. Los resultados se representan como la media ± EEM y se expresan como porcentaje del incremento máximo en fosforilación causado por CCK-8 (1nM) (n=5). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida por CCK-8 (1nM) (p<0,05). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 4.

### 3.3.4. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INTRACELULARES QUE MEDIAN EL EFECTO DEL CARBACOL Y LA CCK-8

Como se describió en el capítulo I, la activación de la PLC da lugar a la hidrólisis del fosfatidilinositol (4,5) bifosfato, produciendo diacilglicerol, que activa a la PKC, e Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, que provoca una rápida movilización de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares, lo que da lugar a un incremento en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>.

Para determinar si la activación de la PKC incrementa la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina, en células acinares pancreáticas, estimulamos dichas células con el éster de forbol TPA (tetradecanoil-12-O-forbol-13-acetato), el cual produce una activación directa de la PKC (Ashendel, 1985). El TPA a las concentraciones 1μM y 30nM produjo un rápido incremento en la fosforilación de FAK y paxilina en residuos de tirosina (figura 15).

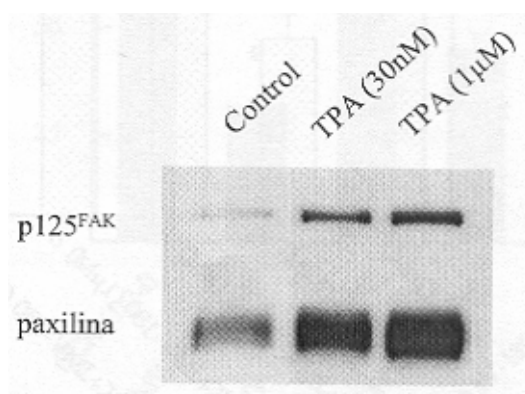


FIGURA 15. Efecto del éster de forbol TPA (30nM y 1μM) en la fosforilación de FAK y paxilina en residuos de tirosina.

El éster de forbol TPA a la concentración 1μM produjo un incremento rápido de la fosforilación de FAK y paxilina en residuos de tirosina. Este incremento alcanzó un máximo alrededor de los 2,5 min de estimulación y se mantuvo constante durante al menos 40 min (figuras 16 y 17). El tiempo de incubación se fijó en 5 minutos.

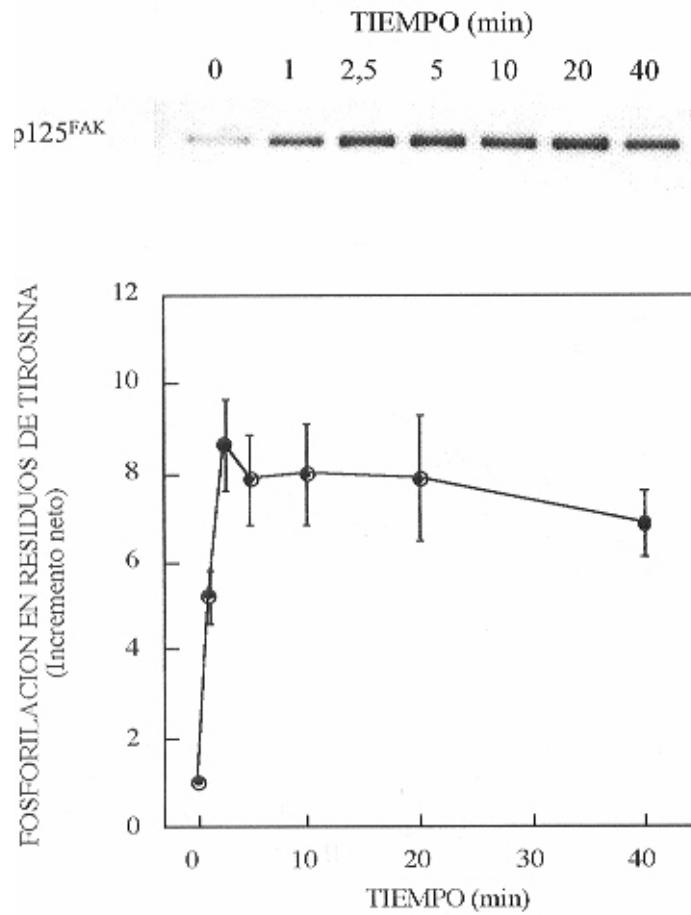


FIGURA 16. Efecto de la estimulación de acinos pancreáticos de rata con **TPA** (1 $\mu$ M) en la fosforilación en residuos de tirosina de la **FAK**. Relación tiempo-incremento en la fosforilación en tirosina. Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media  $\pm$  EEM de los incrementos netos (n=6). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 5.

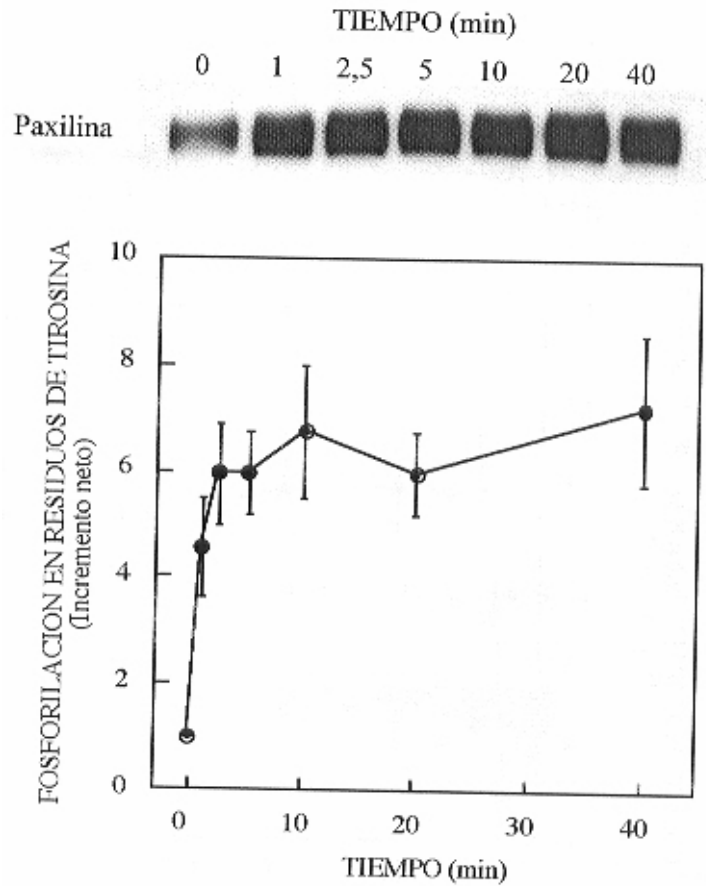


FIGURA 17. Efecto de la estimulación de acinos pancreáticos de rata con TPA (1 $\mu$ M) en la fosforilación en residuos de tirosina de la **paxilina**. Relación tiempo-incremento en la fosforilación en tirosina. Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media  $\pm$  EEM de los incrementos netos (n=6). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 5.

En la figura 18 están representadas las curvas concentración-respuesta para el TPA en fosforilación de FAK y paxilina en residuos de tirosina. Cuando estimulamos acinos pancreáticos durante 5 minutos con TPA (10 $\mu$ M-1nM) las respuestas fueron dependientes de la concentración. Los valores de fosforilación presentan un efecto máximo, a la concentración de 1 $\mu$ M de  $7,9 \pm 1$  y  $5,9 \pm 0,6$  para la FAK y la paxilina respectivamente, y una EC50 de 30nM. El incremento máximo fue similar al obtenido con CCK-8.

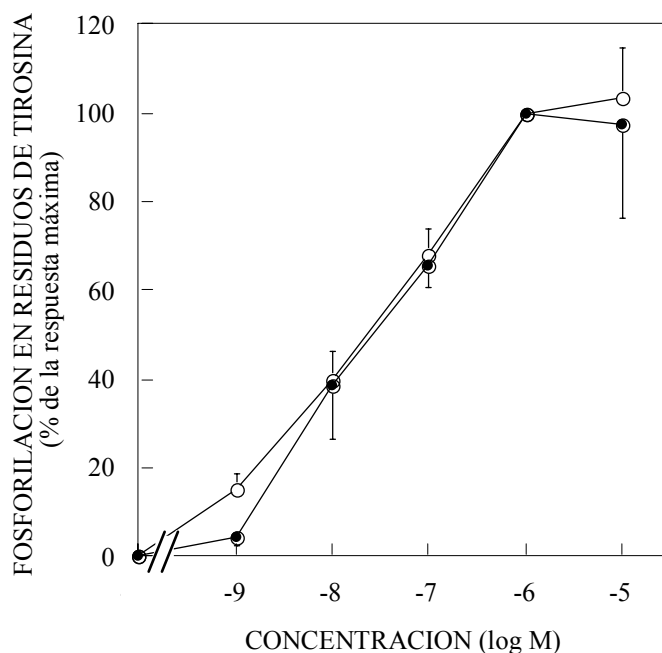


FIGURA 18. Curva concentración-efecto del **TPA** para la fosforilación en residuos de tirosina de la **FAK** (círculos cerrados) y la **paxilina** (círculos abiertos) en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM de los incrementos netos ( $n=4$ ).

Para determinar si el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  provoca la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina en acinos pancreáticos, empleamos el ionóforo del calcio A23187, sustancia que incrementa la  $[Ca^{2+}]_i$  (Reed y cols., 1972).

Las figuras 19 y 20 muestran el efecto del ionóforo del calcio, A23187, a las concentraciones 0,1 y 1  $\mu$ M, en la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina.

El ionóforo del calcio A23187 provocó un incremento neto en fosforilación de la FAK y la paxilina de  $2,3 \pm 0,3$  y  $2,0 \pm 0,2$ , respectivamente a la concentración 1  $\mu$ M, y de  $1,6 \pm 0,3$  y  $1,2 \pm 0,2$ , respectivamente a la concentración 0,1  $\mu$ M ( $n=3$ ). Estos incrementos son claramente inferiores a los obtenidos con CCK-8; la respuesta obtenida con A23187 a las concentraciones 1  $\mu$ M y 0,1  $\mu$ M suponen un  $21,5 \pm 3,5\%$  y  $9 \pm 1,5\%$ , respectivamente, de la respuesta máxima en fosforilación de la FAK producida por la CCK-8 y un  $31 \pm 4,5\%$  y  $6 \pm 3\%$ , respectivamente, de la respuesta máxima obtenida con CCK-8 en la fosforilación de la paxilina.

El éster de forbol TPA a la concentración 30nM causó, respectivamente, un  $50 \pm 5\%$  y  $66 \pm 0,5\%$  (figuras 19 y 20), de la respuesta obtenida con CCK-8 (10nM) en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina. Puesto que en algunas respuestas celulares se ha especulado acerca de un posible efecto sinérgico de la estimulación con TPA y con el ionóforo

del calcio A23187, el siguiente paso consistió en examinar el efecto de la estimulación con ambos activadores, TPA y A23187, durante 5 minutos a 37°C, en la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina. La estimulación con TPA (30nM) y A23187 (1µM) incrementó la fosforilación de la FAK y la paxilina obteniendo valores del 98,5 ± 9% y 125 ± 10 % de la respuesta máxima obtenida con CCK-8 (10nM) (figuras 19 y 20); dicho incremento fue superior al resultado de sumar los valores obtenidos con TPA (30nM) o A23187 (1µM) por separado.

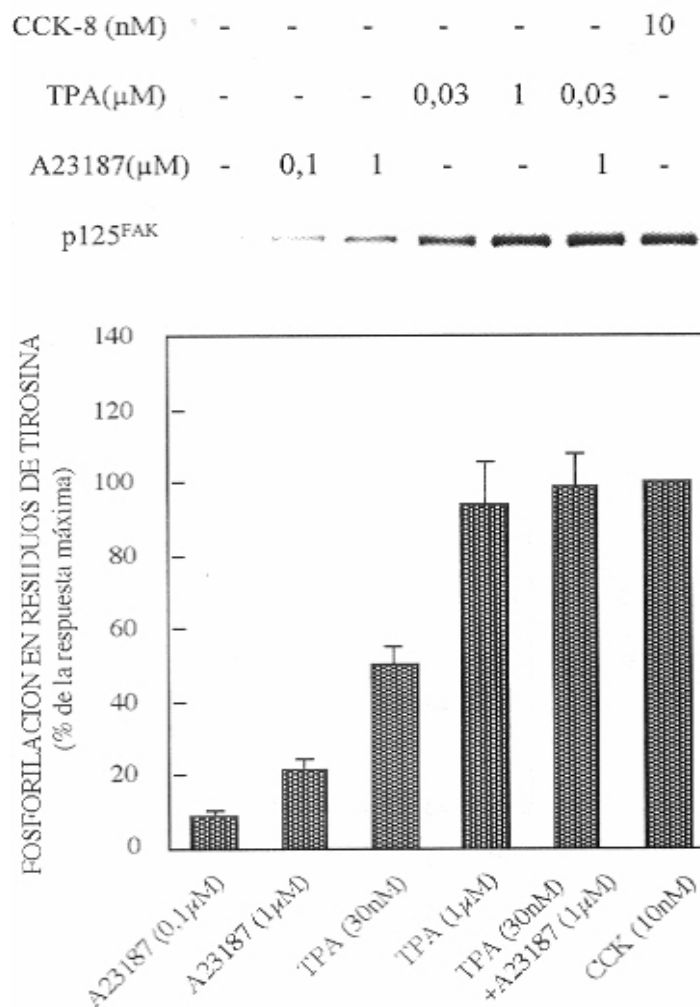


FIGURA 19. Efecto del ionóforo del calcio **A23187** (0,1 y 1µM), **TPA** (30nM) y **A23187** (1µM)+**TPA** (30nM) en la fosforilación en tirosina de la **FAK** en acinos pancreáticos de rata. Los resultados se representan como la media ± EEM y se expresan como porcentaje del incremento en fosforilación causado por CCK-8 (10nM) (n=4). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 3.

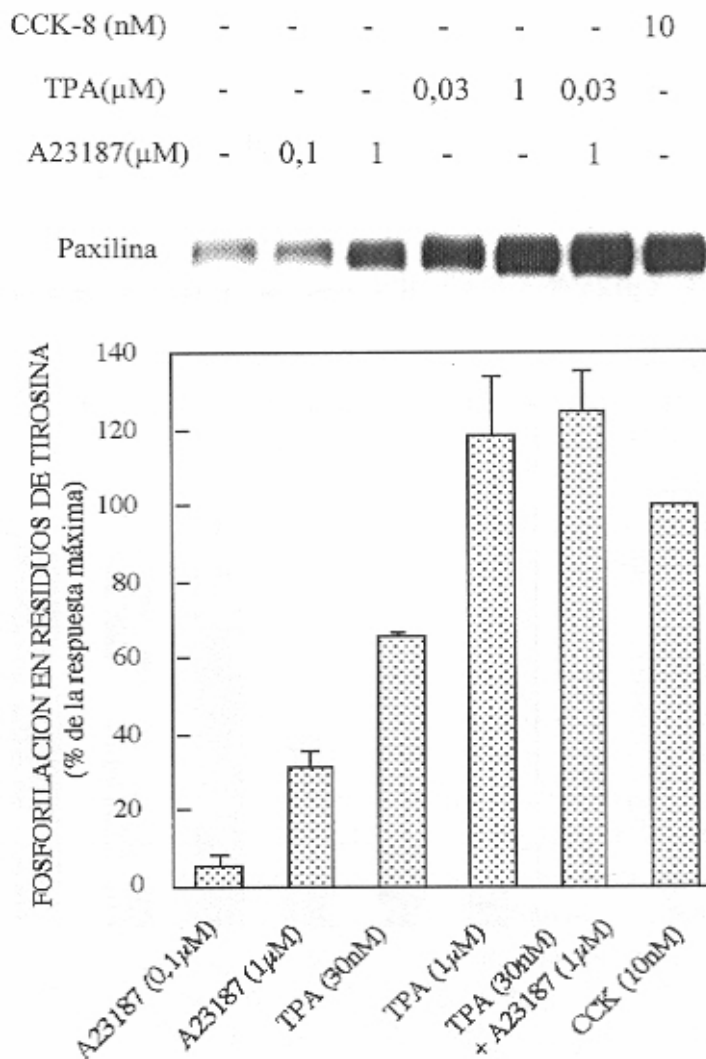


FIGURA 20. Efecto del ionóforo del calcio **A23187** (0,1 y 1μM), **TPA** (30nM) y **A23187** (1μM)+**TPA** (30nM) en la fosforilación en tirosina se la **paxilina** en acinos pancreáticos de rata. Los resultados se representan como la media ± EEM y se expresan como porcentaje del incremento en fosforilación causado por **CCK-8** (10nM) (n=4). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 3.

Con la finalidad de conocer el papel que juegan la PKC y el calcio en la respuesta al carbacol y a la CCK-8, empleamos tratamientos que inhiban específicamente las vías intracelulares descritas anteriormente: el GF109203X como inhibidor de la PKC (Toullec y cols., 1991) y la taspigargina, inhibidor de la ATPasa que introduce calcio en el retículo endoplásmico (Thastrup y cols., 1989), en un medio libre de calcio, para bloquear del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

El tratamiento durante 2 horas de las células acinares pancreáticas con GF109203X (5 $\mu$ M) no causó ningún cambio por sí mismo en la fosforilación de la FAK o la paxilina. Sin embargo, si bloqueó completamente la respuesta al activador de la PKC, TPA (figura 21).

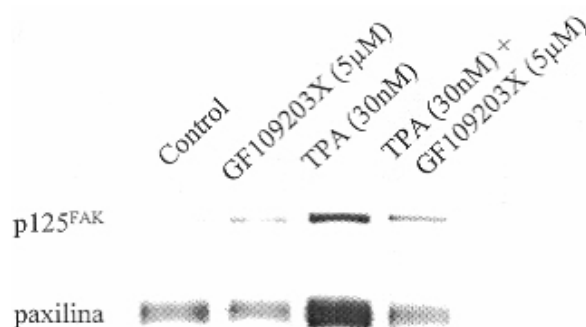


FIGURA 21. Efecto del inhibidor de la PKC, GF109203X, en la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por el éster de forbol TPA (30nM). El experimento que se muestra es representativo de otros 3.

El tratamiento de las células acinares pancreáticas con GF109203X (5 $\mu$ M) no modificó la fosforilación de la FAK (figura 22) ni de la paxilina (figura 23) estimulada por carbacol (1 $\mu$ M) o CCK-8 (0,1nM).



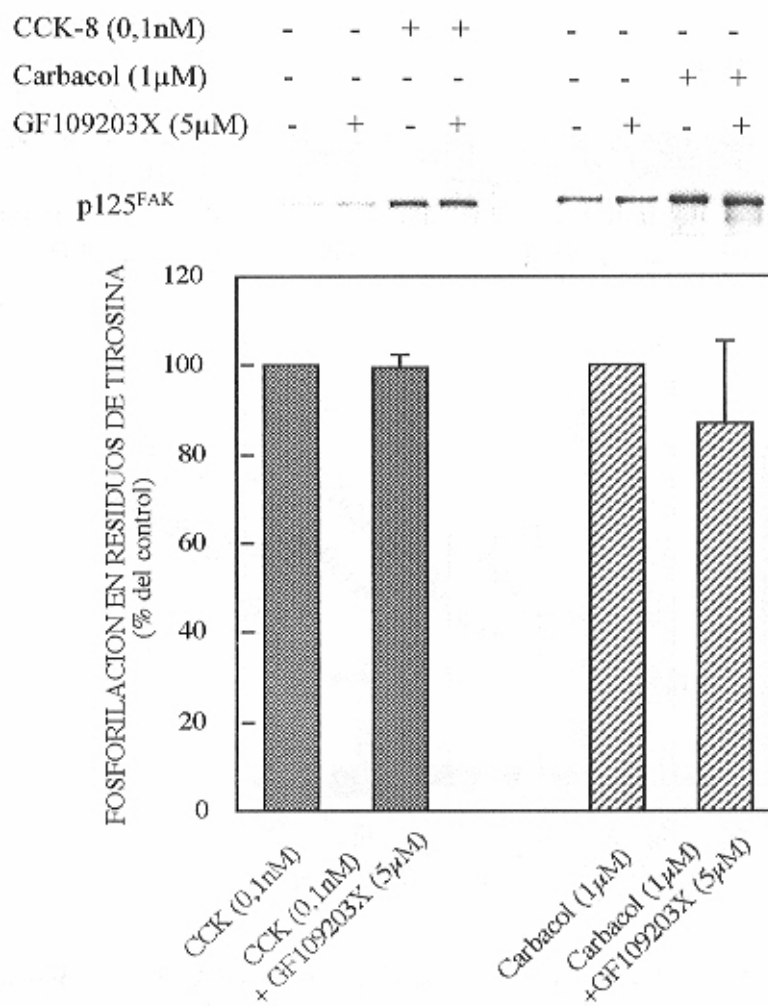


FIGURA 22. Efecto del inhibidor específico de la proteína cinasa C, **GF109203X** (5μM), en la fosforilación en residuos de tirosina de la **FAK** estimulada por **CCK-8** (0,1nM) y **carbacol** (1μM), en acinos pancreáticos de rata. Los resultados se representan como la media ± EEM y se expresan como porcentaje del incremento en fosforilación causado por CCK-8 (0,1nM) o carbacol (1μM) (n=5). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 4.

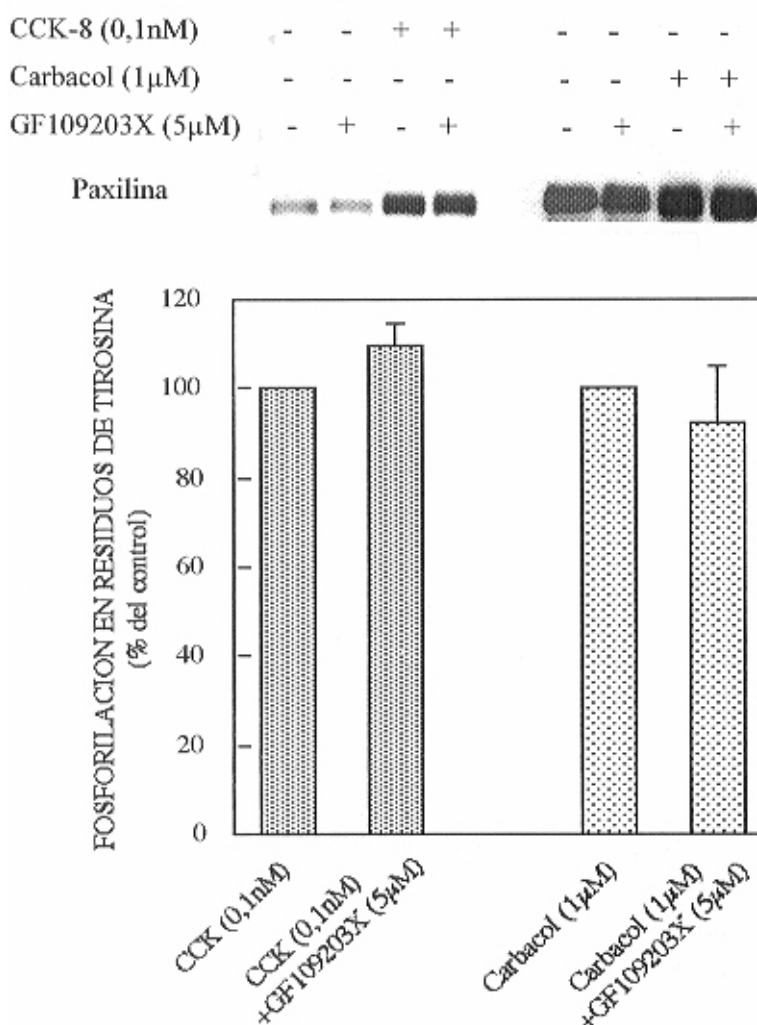


FIGURA 23. Efecto del inhibidor específico de la proteína cinasa C, **GF109203X** (5µM), en la fosforilación en residuos de tirosina de la **paxilina** estimulada por **CCK-8** (0,1nM) y **carbacol** (1µM), en acinos pancreáticos de rata. Los resultados se representan como la media ± EEM y se expresan como porcentaje del incremento en fosforilación causado por CCK-8 (0,1nM) o carbacol (1µM) (n=5). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 4.

El siguiente paso consistió en estudiar el papel de las variaciones en la concentración de calcio intracelular en la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por el carbacol y la CCK-8. Para bloquear esta vía empleamos tapsigargina (un agente que bloquea la ATPasa que introduce ion calcio en el retículo) junto con un tampón libre de calcio (en el que se añadió EGTA a una concentración de 5mM). El pretratamiento de las células acinares pancreáticas de rata con tapsigargina (10µM) durante 1 hora en un tampón libre de calcio consigue anular completamente el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  causado por CCK-8 (10nM) (figura 24).

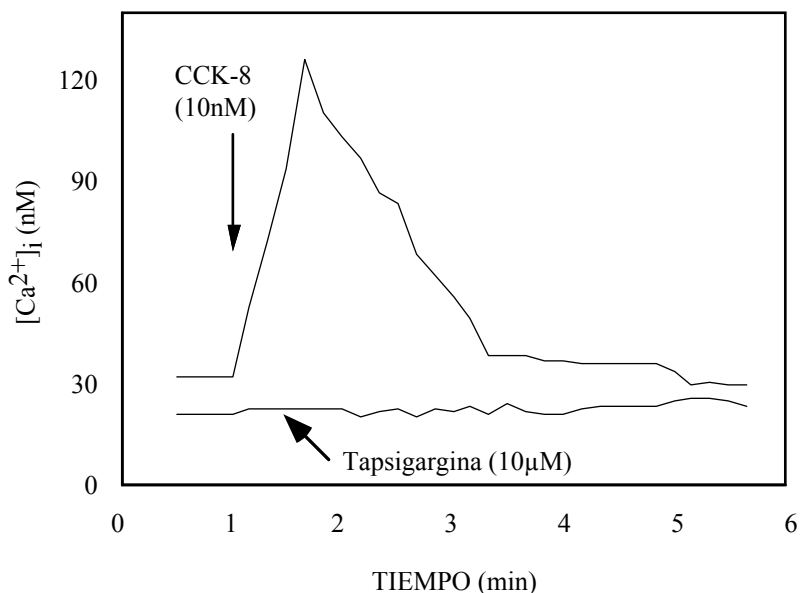


FIGURA 24. Efecto de la CCK-8 (10nM) en la concentración intracelular de calcio en células acinares pancreáticas de rata pretratadas o no con tapsigargina (10 $\mu$ M) durante 1 hora en una solución sin calcio (se añadió EGTA 5mM). El registro mostrado es representativo de otros 5.

El pretratamiento con tapsigargina (10 $\mu$ M) durante 1 hora en un medio sin Ca<sup>2+</sup> no causa ninguna modificación en la fosforilación de FAK o paxilina en residuos de tirosina, tampoco tuvo ningún efecto en la respuesta estimulada por carbacol (1 $\mu$ M). Sin embargo, la combinación de GF109203X y tapsigargina causó una inhibición estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en la fosforilación de la FAK y de la paxilina en residuos de tirosina estimulada por carbacol (1 $\mu$ M), con una reducción del  $57,6 \pm 10,2\%$  y del  $38,9 \pm 12,5\%$ , respectivamente (figuras 25 y 26).

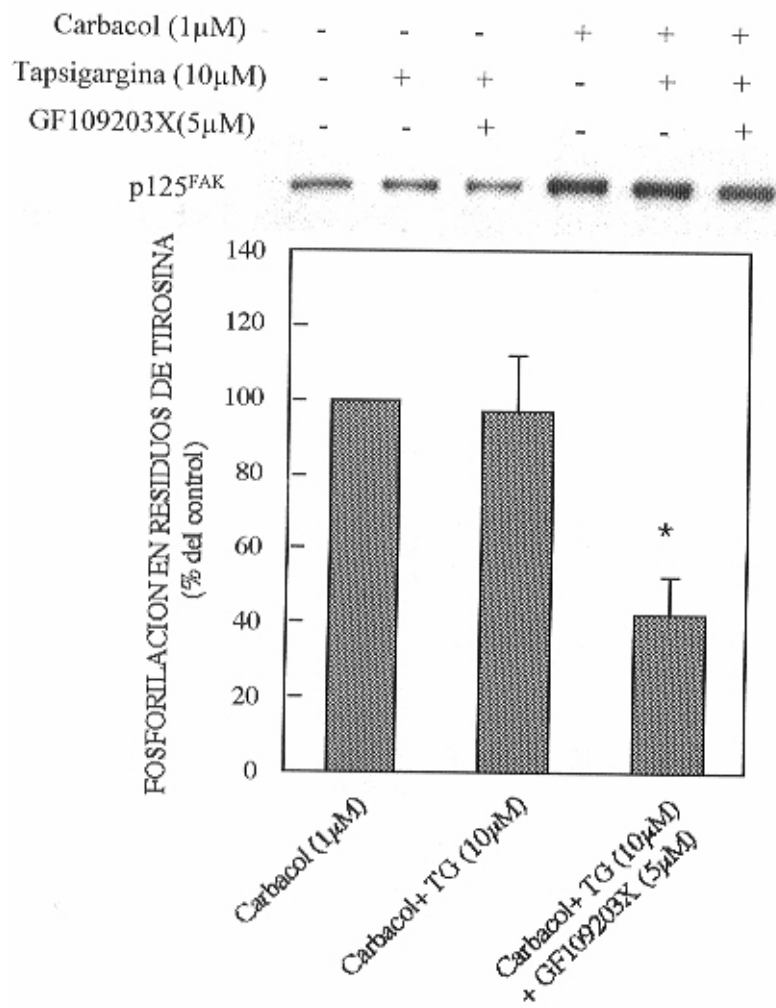


FIGURA 25. Efecto del **carbacol** (1µM) en la fosforilación en residuos de tirosina de la **FAK** en células acinares pancreáticas de rata pretratadas o no con **tapsigargina** (10µM), en un medio libre de calcio, o con **tapsigargina** (10µM) + **GF109203X** (5µM). Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media ± EEM del porcentaje del incremento en fosforilación causado por carbacol (1µM) (n=5). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida por carbacol (1µM) (p<0,05). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 4.

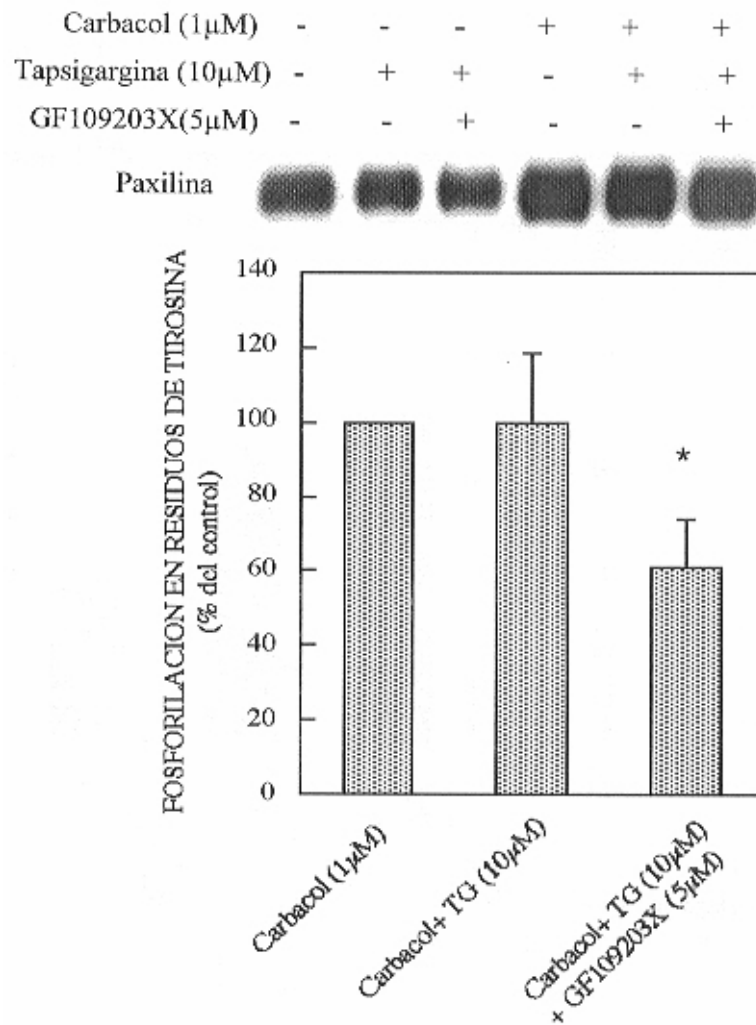


FIGURA 26. Efecto del **carbacol** (1µM) en la fosforilación en residuos de tirosina de la **paxilina** en células acinares pancreáticas de rata pretratadas o no con **tapsigargina** (10µM), en un medio libre de calcio, o con **tapsigargina** (10µM) + **GF109203X** (5µM). Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media ± EEM del porcentaje del incremento en fosforilación causado por carbacol (1µM) (n=5). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida por carbacol (1µM) (p<0,05). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 4.

De modo similar a lo observado para el carbacol, el pretratamiento con tapsigargina (10µM) en una solución libre de calcio no causó ninguna modificación en la respuesta producida por la CCK-8 (0,1nM) en la fosforilación de la FAK y de la paxilina (figuras 27 y 28). Por otro lado, la combinación de ambos inhibidores, GF109203X (5µM) y tapsigargina (10µM) en un medio sin Ca<sup>2+</sup>, provocó una reducción estadísticamente significativa (p<0,05) en la fosforilación de la FAK y de la paxilina en residuos de tirosina estimulada por CCK-8 (0,1nM).

La reducción del incremento neto fue del  $44,5 \pm 12,5\%$  y del  $52 \pm 4,5\%$  para la FAK y la paxilina, respectivamente (figuras 27 y 28).

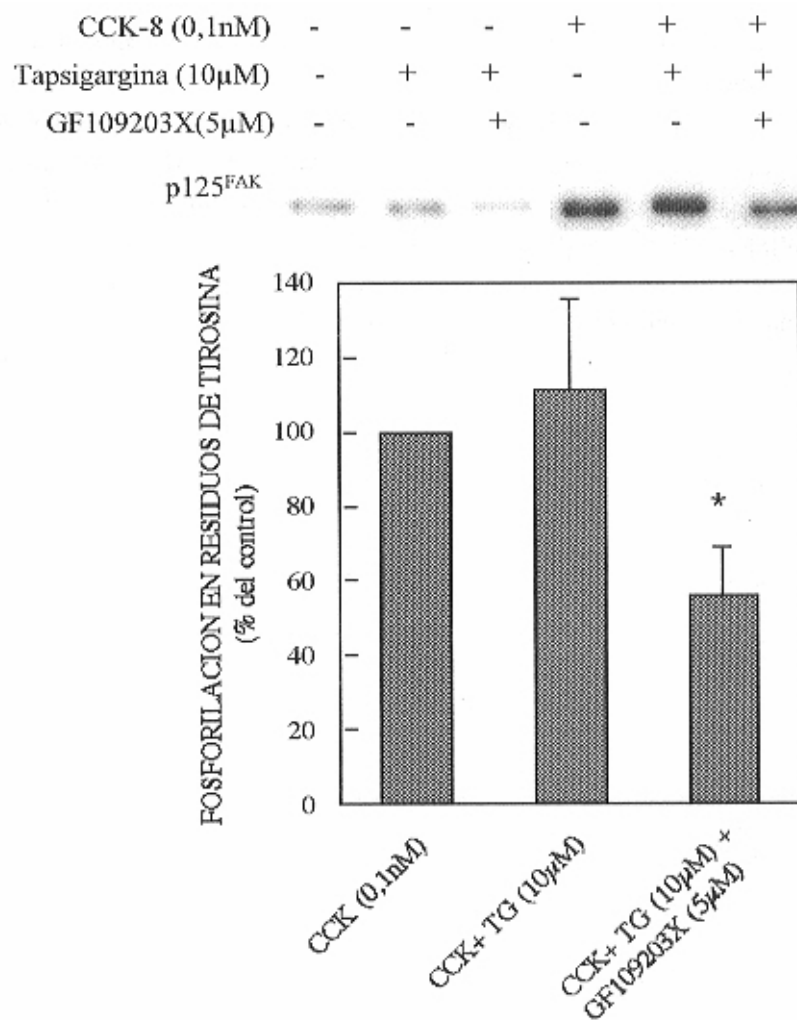


FIGURA 27. Efecto de la CCK-8 (0,1nM) en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK en células acinares pancreáticas de rata pretratadas o no con **tapsigargina** (10µM), en un medio libre de calcio, o con **tapsigargina** (10µM) + **GF109203X** (5µM). Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media  $\pm$  EEM del porcentaje del incremento en fosforilación causado por CCK-8 (0,1nM) (n=4). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida por CCK-8 (0,1nM) (p<0,05). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 3.

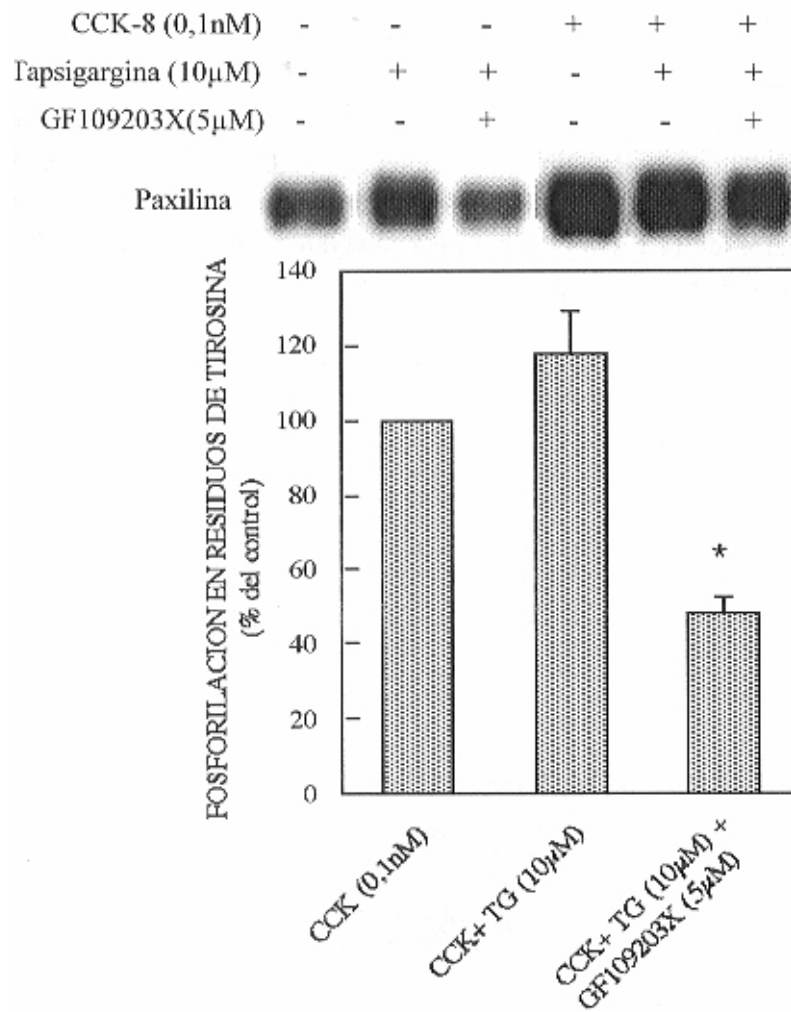


FIGURA 28. Efecto de la **CCK-8** (0,1nM) en la fosforilación en residuos de tirosina de la **paxilina** en células acinares pancreáticas de rata pretratadas o no con **tapsigargina** (10µM), en un medio libre de calcio, o con **tapsigargina** (10µM) + **GF109203X** (5µM). Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media ± EEM del porcentaje del incremento en fosforilación causado por CCK-8 (0,1nM) (n=4). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida por CCK-8 (0,1nM) (p<0,05). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 3

### 3.3.5. EFECTO DEL VIP Y DE LA SECRETINA EN LA FOSFORILACION DE LA FAK Y LA PAXILINA. VIA DEL AMPCICLICO.

Como se describió en el capítulo I, el VIP y la secretina son dos agentes que activan la adenilato ciclasa tras la unión a sus receptores de membrana, provocando el incremento en la concentración de AMPc. Con el objeto de estudiar la implicación de esta vía intracelular en la fosforilación de la FAK y la paxilina ensayamos el efecto del VIP y la secretina en acinos pancreáticos de rata.

El resultado obtenido tras incubar acinos pancreáticos durante 5 minutos con VIP (1µM) o secretina (1µM) se representan en la figura 29 junto con los incrementos obtenidos con las dosis máximas de CCK-8 (10nM) o carbacol (10µM).

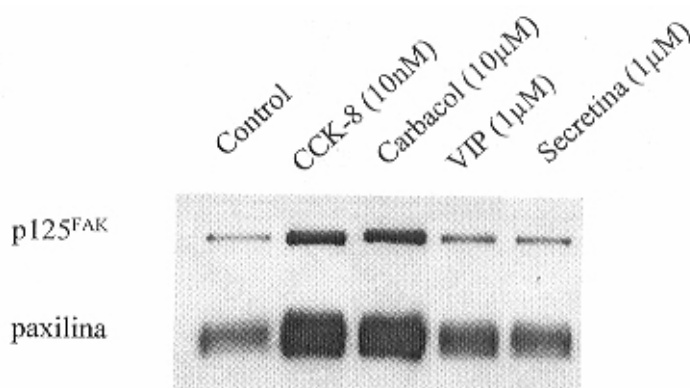


FIGURA 29. Efecto de la estimulación de células acinares pancreáticas con CCK-8 (10nM), carbacol (10µM), VIP (1µM) y secretina (1µM) en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina.

Como puede apreciarse en la figura 29 ni el VIP ni la secretina estimulan la fosforilación de la FAK o la paxilina en residuos de tirosina en contraste con el claro efecto que se observa al estimular las células acinares con CCK-8 o carbacol.

Para incrementar la concentración de AMPc intracelular se empleó 8-Br-AMPc, un análogo del AMPc más resistente a la acción de las fosfodiesterasas (Boyer y Thiery, 1993) y se estudió su efecto en la fosforilación de la FAK y la paxilina.

El efecto obtenido tras la estimulación de acinos pancreáticos con 8-Br-AMPcíclico (8-Br-AMPc) (1mM) se muestra en las figuras 30. Como puede apreciarse en la imagen, el incremento de la concentración de AMPc en el citosol no modificó la tasa de fosforilación en residuos de tirosina de ninguna de las proteínas estudiadas.



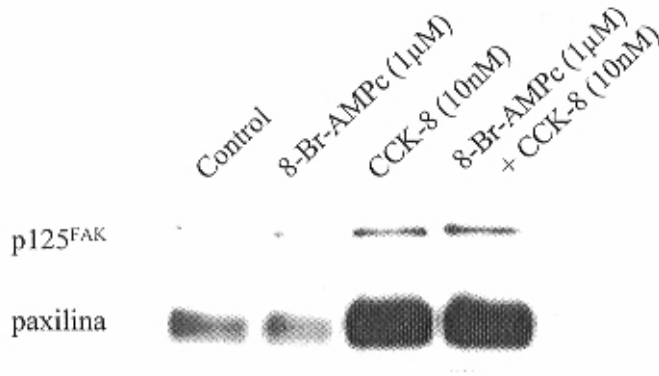


FIGURA 30. Efecto de la estimulación de células acinares pancreáticas con 8-Br-AMPC (1mM), CCK-8 (10nM) y 8-Br-AMPC+CCK-8 en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina. La figura muestra un experimento representativo de otros 5.

A continuación estudiamos la posible interacción entre el incremento de la concentración intracelular de AMPc y la fosforilación de FAK o paxilina en residuos de tirosina estimulada por secretagogos como la CCK-8. Los incrementos en la concentración de AMPc provocados por el 8-Br-AMPC no modificaron la respuesta a la CCK-8 (figura 30), de modo similar el VIP a ninguna de las concentraciones ensayadas (1µM-0,1nM) modificó la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por CCK-8 (figura 31).

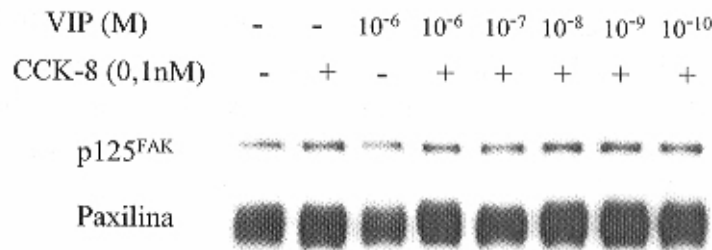


FIGURA 31. Efecto de diferentes concentraciones de VIP (1µM - 0,1nM) en la fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas FAK y paxilina en células acinares pancreáticas de rata estimuladas con CCK-8 (0,1nM). La figura muestra un experimento representativo de otros 5.

### 3.4 DISCUSIÓN

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la activación de un gran número de receptores acoplados a proteínas G de membrana, que carecen de actividad tirosina cinasa intrínseca, puede estimular la fosforilación de diferentes proteínas en residuos de tirosina (Zachary y cols., 1991; Leeb-Lundberg y cols., 1994; Duan y cols., 1994; Seufferlein y cols., 1995). La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina da lugar al inicio de una cascada de señales intracelulares que probablemente tienen una gran importancia en la fisiología celular (Zachary y cols., 1991; Leeb-Lundberg y cols., 1994). Estudios previos, han demostrado que la ocupación de receptores colinérgicos muscarínicos por el carbacol estimula la fosforilación en residuos de tirosina de numerosas proteínas en fibroblastos a los que se han transferido receptores muscarínicos; entre ellas están las proteínas que componen la cascada de las MAP cinasas, la FAK, la p130<sup>cas</sup> y ligeramente la PI3-cinasa (Gutkind y Robins, 1992; Crespo y cols., 1994). Igualmente, se ha comprobado que la CCK-8 estimula la fosforilación de numerosas proteínas intracelulares, entre las que se encuentran las MAP cinasas (p42<sup>mapk</sup> y p44<sup>mapk</sup>) (Duan y Williams, 1994), las MEK cinasas (p43 y p44) (Duan y cols., 1995), las Jun cinasas (p46-p55) (Dabrowski y cols., 1996). También se ha observado que la CCK-8, a través de la ocupación de los receptores CCK<sub>B</sub> transferidos a células 3T3 (Taniguchi y cols., 1994) o fibroblastos Rat-1 (Seufferlein y cols., 1995), puede estimular la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK, la paxilina y la MAP cinasa. De modo similar, otros neuropéptidos como la bombesina, la vasopresina, la endotelina o la bradicinina causan fosforilación de la FAK y la paxilina en diferentes tejidos (Zachary y cols., 1991; Huckle y cols., 1992).

Nuestros resultados demuestran que la estimulación de células acinares pancreáticas con carbacol o CCK-8 produce un incremento rápido en la fosforilación en residuos de tirosina en al menos cinco bandas que contienen proteínas de pesos moleculares superiores a 60 KDa. La identificación posterior con los anticuerpos específicos anti-FAK y anti-paxilina evidenció que dos de las anteriores bandas, las correspondientes a los pesos moleculares 126 y 79 KDa, contienen, al menos, la proteína tirosina cinasa FAK y la proteína citoesquelética paxilina, respectivamente. Esto se demuestra porque cuando inmunoprecipitamos con un anticuerpo anti-tirosina fosforilada seguido por la identificación de las proteínas con los anticuerpos específicos anti-FAK y anti-paxilina, o bien, cuando los anticuerpos son utilizados en orden reverso, en ambos casos se observa la aparición de una única banda fosforilada en tirosina (figura 1, paneles B y C).

La estimulación de acinos pancreáticos con carbacol o CCK-8 produce un incremento en la fosforilación de la FAK y de la paxilina dependiente tanto del tiempo como de la concentración. Para ambos agonistas la fosforilación máxima se produjo entre 2,5 y 5 minutos tanto para la FAK como para la paxilina. En el caso del carbacol, el incremento observado en la fosforilación de la FAK y la paxilina es menor a medida que aumenta el tiempo de estimulación, llegando a ser aproximadamente un 50% del máximo a los 20 minutos. Este patrón de fosforilación similar para ambas proteínas en respuesta al carbacol, podría indicar una relación enzima-sustrato entre la FAK y la paxilina, relación que ha sido descrita en otros sistemas celulares (Schaller y Parsons, 1995). Sin embargo, tras la estimulación con CCK-8, si bien la FAK presenta un patrón respecto del tiempo similar al observado al estimular con carbacol, la paxilina mantiene una fosforilación máxima durante al menos 20 minutos. Esta diferencia de patrón de fosforilación respecto del tiempo podría explicarse considerando la posibilidad de que la estimulación con CCK produce la activación de otras tirosinas cinasas de las que puede ser sustrato la paxilina, como por ejemplo la p60<sup>SRC</sup> (Tsunoda y cols., 1996). Un patrón similar de fosforilación de la FAK respecto del tiempo se ha observado en respuesta a bradicinina y neurotensina en células tumorales de pulmón (Tallett y cols., 1996), a bradicinina en células 3T3 (Leeb-Lundberg y Song, 1991) y a endotelina en células Rat-1 (Saville, 1994). Sin embargo, no se ha observado este mismo patrón tras la estimulación con GRP en células tumorales de pulmón (Tallett y cols., 1996) o en células Swiss 3T3 (Sinnott-Smith y cols., 1993). De momento no disponemos de una explicación concluyente para las diferencias observadas en el patrón de fosforilación respecto al tiempo de la FAK y de la paxilina.

El efecto del carbacol y la CCK-8 en la fosforilación de la FAK y la paxilina fue dependiente de la concentración. Las concentraciones de ambos agonistas utilizadas se encuentran dentro del rango de concentraciones para las que se han descrito la mayoría de sus efectos fisiológicos (Jensen, 1994). La eficacia o EC50, calculada a partir de nuestros resultados para el carbacol y la CCK-8 en la fosforilación de FAK y paxilina, es del mismo orden de magnitud que la calculada para la secreción de amilasas y el incremento de la concentración de calcio citosólico estimulados por los agonistas antes citados (Tabla 1).

<b>Tabla 1. Eficacia del carbacol y la CCK para producir diferentes efectos biológicos (EC50)</b>				
	Fosforilación de proteínas	Incremento en [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Secreción de amilasas	Binding
Carbacol	1μM	5μM	0,4μM	100μM
CCK-8	0,1nM	0,2nM	0,02nM	10nM
<i>Datos calculados a partir de resultados propios y de los mostrados por Jensen, 1994 y Muallen y cols., 1989</i>				

Las curvas de fosforilación se encuentran dos unidades de logaritmo a la izquierda respecto a los datos de binding, tanto para el carbacol como para la CCK-8 (Tabla 1). Esto implica que una ocupación submáxima de los receptores produce una respuesta máxima en la fosforilación de las proteínas estudiadas, lo cual supone un ahorro en la utilización de los receptores.

Estos resultados tienen semejanzas y diferencias con el acoplamiento de los receptores de otros neuropéptidos con estas rutas intracelulares. Nuestros resultados son similares a los observados tras la activación del receptor del GRP en células Swiss 3T3 (Sinnnet-Smith y cols., 1993), de la neuromedina B en células C-6 y en fibroblastos Rat-1 donde se ha transferido el receptor de la neuromedina B (Lach y cols., 1995) y a la activación de los receptores CCK<sub>B</sub> transferido en fibroblastos Rat-1 (Seufferlein y cols., 1995), en los que la activación submáxima del receptor produce respuestas máximas en fosforilación de la FAK y la paxilina y en la movilización de calcio. Por el contrario, nuestros resultados difieren de los obtenidos con GRP o neuromedina B en la magnitud del ahorro de receptores, ya que el ahorro de la ocupación de receptores para el carbacol y la CCK para producir la estimulación de la fosforilación de estas proteínas e inducir incrementos en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> es mucho mayor que el observado en el caso del GRP y la NMB(Sinnnet-Smith y cols., 1993; Lach y cols., 1995).

Como se ha demostrado anteriormente (Zhou y cols., 1995), en acinos pancreáticos de rata solo se han descrito receptores para la CCK<sub>A</sub>, resultados que encuentran confirmación en nuestro trabajo con el empleo del antagonista específico del receptor CCK<sub>A</sub>, L-364,718 (Jensen y Gardner, 1991), agente que anula completamente la fosforilación de las proteínas en estudio en respuesta a la CCK-8 (Figuras 11 y 12). Como ya hemos citado anteriormente, el receptor CCK<sub>A</sub> presenta al menos dos estados de afinidad, el de alta y el de baja (Sankaran y cols., 1980). Nuestros resultados demuestran que el incremento en la fosforilación de la FAK y la paxilina estuvo mediado por la ocupación de los estados de alta y baja afinidad de los receptores

CCK<sub>A</sub> en acinos pancreáticos de rata, afirmación esta que encuentra justificación en los siguientes hechos experimentales. Primero, la incubación de células acinares pancreáticas con JMV-180, agonista específico del estado de alta afinidad del receptor CCK<sub>A</sub> (Howard y cols., 1984), produjo un claro incremento en la fosforilación de la FAK y la paxilina; el efecto observado fue dependiente del tiempo y de la concentración. Segundo, en todos los experimentos realizados, el efecto máximo en fosforilación observado tras la incubación con JMV-180 fue aproximadamente el 50% del efecto máximo obtenido tras la incubación con CCK-8. Esto nos hizo plantearnos la posible participación de la ocupación del estado de baja afinidad del receptor CCK<sub>A</sub> en el incremento observado en la fosforilación de FAK y paxilina tras la incubación de acinos pancreáticos con CCK-8. Tercero, la posible participación del estado de baja afinidad del receptor CCK<sub>A</sub> en la respuesta observada también está apoyado por el amplio rango de concentraciones de CCK en el cual se produce fosforilación de ambas proteínas. Se ha descrito anteriormente que con estas concentraciones de CCK se produce la ocupación tanto del estado de alta como de baja afinidad del receptor. Finalmente, el JMV-180, en tanto que antagonista del estado de baja afinidad del receptor CCK<sub>A</sub>, produjo una clara inhibición del incremento en fosforilación de FAK y paxilina observado tras la estimulación de acinos pancreáticos con CCK-8, siendo este efecto dependiente de la concentración de JMV-180 utilizada (figuras 13 y 14).

Estudios recientes han sugerido que la activación de la PLC puede ser importante en la fosforilación de la FAK y de la paxilina. Así, la angiotensina II incrementa la fosforilación de la FAK en células hepáticas a través de una vía dependiente de calcio (Huckle y cols., 1992); y la estimulación de la fosforilación de la FAK por epinefrina en plaquetas es bloqueada por la inhibición de los incrementos en la concentración de calcio citosólico (Shattil y cols., 1994). Por otro lado, la activación de la PKC por ésteres de forbol incrementa la fosforilación de la FAK en células Swiss 3T3 (Sinnnet-Smith y cols., 1993). Shattil y cols (1994) demostraron que el bloqueo de la activación de la PKC en plaquetas inhibe la fosforilación de la FAK estimulada por epinefrina. Por el contrario la fosforilación de la FAK estimulada por GRP en células Swiss 3T3 (Sinnnet-Smith y cols., 1993) no se ve afectada ni por la inhibición en la movilización de calcio ni por el bloqueo de la activación de la PKC. Además, la fosforilación de la paxilina estimulada por la ocupación del receptor del GRP no se modifica cuando se bloquea la activación de la PKC o la movilización de calcio (Zachary y cols., 1993). Estos resultados demuestran que la activación de la cascada de señales iniciada por la PLC tiene distinta importancia en la capacidad mostrada por diferentes agonistas para producir fosforilación de la FAK y la paxilina. Nuestros resultados demuestran que el ionóforo del calcio A23187 provoca un pequeño incremento en la fosforilación de la FAK y la paxilina, lo cual indica que el

incremento en la concentración de calcio citosólica tiene un mínimo efecto en la fosforilación de estas proteínas. Que el incremento en la concentración de calcio citosólico no representa por sí solo un papel esencial en la respuesta al carbacol o la CCK-8 se comprobó mediante el pretratamiento con tapsigargina en un medio libre de calcio. El tratamiento empleado bloqueó por completo el aumento de la concentración de calcio estimulada por estos agonistas; sin embargo, careció de efecto en la fosforilación de la FAK y la paxilina. Por otro lado, la activación de la PKC por el éster de forbol TPA causó un rápido incremento en la fosforilación de ambas proteínas, siendo la magnitud de este incremento similar a la observada para el carbacol o la CCK-8. Nuestros resultados sugieren que, de modo similar a como ocurre con los cambios en  $[Ca^{2+}]_i$ , la sola activación de la PKC no tiene un papel muy importante en la mediación de la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por el carbacol o la CCK-8. Esta afirmación está apoyada por la falta de efecto que el tratamiento de las células acinares pancreáticas con el inhibidor de la PKC, GF109203X, a concentraciones que bloquea completamente la respuesta al TPA, presenta sobre la respuesta al carbacol o la CCK-8. Algunos autores han demostrado que la activación simultánea de la PKC y el incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  presenta efectos sinérgicos en un gran número de respuestas celulares, como la fosforilación de distintas proteínas (Williams y Yule, 1993; Walsh, 1994), la secreción de aldosterona en la corteza adrenal (Kojima y cols., 1983) o la secreción de amilasas (Williams y Yule, 1993; Jensen, 1994). En nuestro estudio, la estimulación simultánea de la PKC con el éster de forbol TPA y del incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el A23187 provocó un aumento en fosforilación de la FAK y la paxilina superior al observado con cada uno de estos tratamientos por separado. El incremento observado se asemejó al efecto máximo producido por la CCK-8. Así pues, la activación simultánea de ambos procesos podría ser importante para la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol o CCK-8 en células acinares pancreáticas. Esta afirmación está apoyada por el hecho de que la combinación del GF109203X y la tapsigargina, a concentraciones que inhiben completamente los incrementos en fosforilación estimulados por TPA y la movilización de calcio estimulada por los agonistas estudiados, respectivamente, inhibe la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por el carbacol y la CCK-8 aproximadamente en un 50%. Estos resultados demuestran que el carbacol y la CCK-8 estimulan la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina por rutas intracelulares dependientes e independientes de la PKC y el calcio. Resultados estos que coinciden con los obtenidos por Shattil y cols. (1994) al examinar el efecto de la trombina en la fosforilación de la FAK en plaquetas. En este estudio, la fosforilación de la FAK en respuesta a trombina no se modifica por el BAPTA, un quelante intracelular de calcio, y solo se inhibe parcialmente por el GF109203X; sin embargo, la inhibición de ambas rutas intracelulares bloqueó completamente la respuesta a la trombina. Se podrían proponer al menos tres posibles explicaciones para los

resultados obtenidos. Una de ellas sería que la potenciación entre la PKC y los incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$  sería tan sensible que pequeñas activaciones de cualquiera de estas vías, no detectables con los métodos usados, podrían producir dicha potenciación y por lo tanto la respuesta máxima. Así cuando la ruta de la PKC o del calcio estuviera inhibida, pequeñas activaciones en estas rutas potenciarían los efectos causados por la otra vía, dando como resultado la respuesta máxima. Aunque esta posibilidad parece la menos probable no podemos descartarla. Otra explicación sería que la estimulación del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  o la activación de la PKC sería suficiente por sí solo para producir el 50% de la estimulación máxima que ocurre al activar la fosforilación de la FAK y la paxilina por la ruta dependiente de la PLC. Por último, cabría la posibilidad que las rutas de la PKC y el calcio tengan efecto sinérgico entre sí y con la vía independiente de la PLC; de este modo, aunque se bloquease una de ellas se conseguiría el efecto máximo observado para el carbacol o la CCK-8.

A la vista que numerosos agonistas que estimulan rutas intracelulares de muy diversa índole provocan la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina, nos planteamos estudiar el efecto del VIP y la secretina, agentes que producen la activación de la adenilato ciclasa y por consiguiente que incrementan la concentración intracelular de AMPc, en la fosforilación de las proteínas aludidas anteriormente. Nuestros resultados demuestran claramente que la estimulación de células acinares pancreáticas de rata con secretina o VIP carece de efecto en la fosforilación de la FAK y la paxilina. De modo similar, la incubación de estas células con 8-Br-AMPc, un análogo más estable del AMPc, careció de efecto en fosforilación de las proteínas estudiadas. Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que el incremento en la concentración de AMPc no estimula la fosforilación de la FAK y la paxilina, también demuestran que el VIP o los incrementos en la concentración de AMPc usando el 8-Br-AMPc no presenta ningún tipo de interacción con la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por CCK-8. Esta última afirmación se apoya en los resultados obtenidos al estimular acinos pancreáticos de rata conjuntamente con CCK-8 y 8-Br-AMPc (figura 30) o CCK-8 y diferentes concentraciones de VIP (figura 31).

CAPÍTULO 4

LOS CONTACTOS FOCALES.  
EL CITOESQUELETO



## 4.1. INTRODUCCIÓN

### 4.1.1. LAS PLACAS DE ADHESIÓN FOCAL

Las adhesiones focales, también conocidas como contactos focales, son unas regiones concretas de la célula donde existe una relación muy estrecha entre la membrana celular y la matriz extracelular. La matriz extracelular está compuesta por proteínas tales como el colágeno, la fibronectina y la vitronectina (Luna y Hitt, 1992). La organización estructural de las placas de adhesión focal es muy compleja. Entre los elementos que constituyen las placas de adhesión focal se encuentran:

-Las **integrinas**, unos receptores transmembranales heterodiméricos (constituidos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ) que actúan como nexo de unión entre la membrana celular y la matriz externa. Las integrinas presentan un dominio extracelular, por el que se unen determinadas sustancias provenientes de la matriz extracelular, y unos cortos dominios citoplasmáticos que interaccionan con el citoesqueleto. Físicamente, las integrinas unen la matriz externa a los filamentos de actina del citoesqueleto y pueden actuar para transmitir señales de la matriz extracelular al interior celular a través del citoesqueleto (Schwartz, 1992).

-La **tirosina cinasa, p125<sup>FAK</sup>** y sus sustratos, *paxilina* y *p130<sup>cas</sup>*: Se cree que juegan un papel central en las señales intracelulares derivadas de la activación de las integrinas, participando en la reorganización de las placas de adhesión focal como se comentó en el capítulo anterior. Si bien la unión de las integrinas a sus ligandos provoca fosforilación de la p125<sup>FAK</sup> en restos de tirosina, parece ser que tanto los incrementos transitorios de calcio intracelular, como la actividad de la proteína cinasa C, podrían ser requeridos como coestimuladores para la fosforilación de la p125<sup>FAK</sup> (Bellis y cols., 1995; Clark y Brugge, 1995; Harte y cols., 1996).

-La **actina** es el componente estructural de los microfilamentos y será estudiada en profundidad más adelante.

-La  **$\alpha$ -actinina** es un homodímero cuya función es proporcionar cohesión entre los filamentos de actina. También se une al dominio citoplasmático de las integrinas, a la vinculina y a la fosfatidilinositol 3' cinasa (PI-3 cinasa) (Clark y Brugge, 1995).

-La **talina** es una proteína que se une al dominio citoplasmático de las integrinas, así como a la vinculina y a la p125<sup>FAK</sup> (Chen y cols., 1994; Otey, 1996).

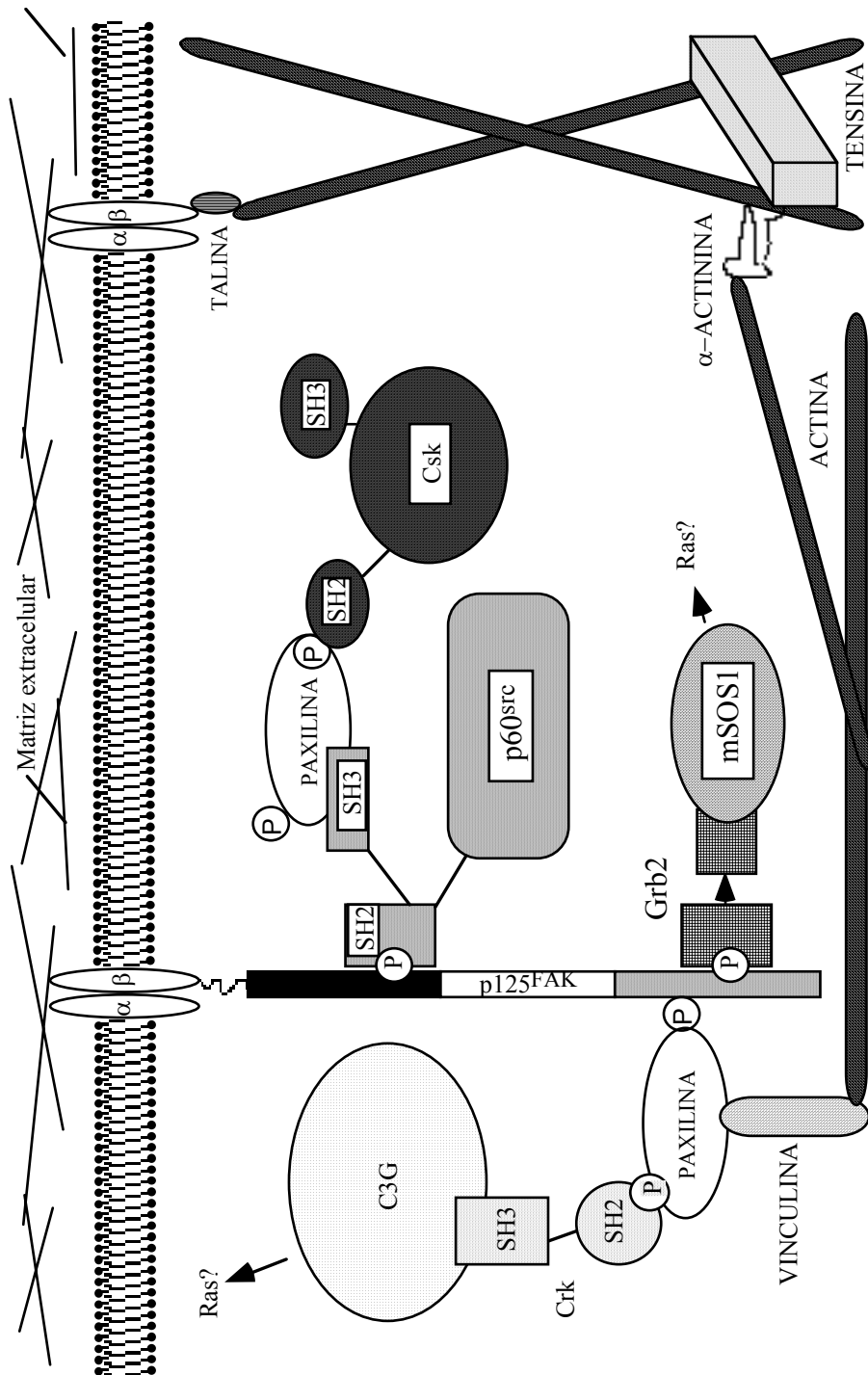
-La ***vinculina*** es una proteína que se une a la talina, la paxilina, la  $\alpha$ -actinina, la tensina y a los microfilamentos de actina (Clark y Brugge, 1995).

-La ***tensina*** es una proteína que contiene un dominio SH2 (homología Src 2). Este dominio dirige las interacciones proteína-proteína, promoviendo uniones estables entre proteínas cuyas secuencias peptídicas contienen una fosfotirosina (Pawson y Gish, 1992). Se une a la vinculina y a los filamentos de actina (Clark y Brugge, 1995).

-La ***zixina***, una proteína que se une a la  $\alpha$ -actinina y a una proteína denominada proteína rica en cisteína o cCRP. Ambas proteínas, zixina y cCRP poseen dominios comunes, denominados LIM, descritos en el apartado dedicado a la paxilina (capítulo IV) que favorecen la interacción proteína-proteína (Sadler y cols., 1992; Otey, 1996).

Es importante resaltar el papel primordial que la fosforilación de proteínas en restos de tirosina juega en la formación y organización de las placas de adhesión focal como ha sido demostrado por numerosos autores (Davis y cols., 1991; Schaller y cols., 1992; Schaller, 1996).

En el diagrama de la página siguiente se representa esquemáticamente la estructura de las placas de adhesión focal, así como la relación existente entre las distintas proteínas que las componen y proteínas relacionadas que se describirán más adelante.



Cuando un componente de la matriz extracelular se une a las integrinas el primer fenómeno que se observa es la fosforilación de distintas proteínas en restos de tirosina. De igual modo, algunas serina treonina cinasas, tales como la proteína cinasa C y las proteínas cinasas de las proteínas activadas por la mitogénesis (MAP cinasas) también son activadas por este mismo fenómeno; incluso, se ha observado un incremento en la concentración de calcio intracelular (Juliano y Haskill, 1993).

Se ha identificado un gran número de proteínas que están relacionadas con las placas de adhesión focal en virtud de su localización, y que la unión de las integrinas a la matriz extracelular provoca su activación, como son:

**-Proteínas de la familia Src:** Estas tirosinas cinasas contienen dominios SH2 y SH3 y se asocian con los complejos proteicos de las placas de adhesión focal, principalmente con la FAK y la paxilina. Como se describió en el capítulo anterior, estas proteínas participan en la regulación de la actividad de la FAK (Ren y cols, 1993)

**-Csk:** Es una tirosina cinasa que presenta un dominio SH2 y cuya función es supresora de la actividad cinasa de las proteínas de la familia Src. Está asociada con la FAK y la paxilina.

**-Proteína cinasa C:** Es una serina-treonina cinasa que se describió con mayor profundidad en el capítulo I. Se ha observado su localización en las placas de adhesión focal, siendo activada y regulada por el diacilglicerol y el calcio intracelular respectivamente (Clark y Brugge, 1995).

**-MAP cinasas:** Son serina-treonina cinasas que cuando son activadas se fosforilan tanto en residuos de tirosina como de treonina. Su activación y la participación en mecanismos intracelulares se describió en el capítulo anterior(Clark y Brugge, 1995).

**-Crk:** Es una proteína que contiene dominios tanto SH2 como SH3. Pertenece a una familia de proteínas conocida como *proteínas adaptadoras SH2-SH3*. La función de esta familia de proteínas, que carecen de dominio catalítico, es favorecer la interacción proteína-proteína actuando como intermediarios o interfases. La función de la Crk en concreto es la de favorecer la interacción entre la paxilina, fosforilada en restos de tirosina, y la proteína C3G, a través de los dominios SH2 y SH3, respectivamente, de la Crk (Clark y Brugge, 1995).

**-Grb2:** Es otra proteína perteneciente a la familia de las proteínas adaptadoras SH2-SH3. Está asociada a la FAK, a través de su dominio SH2 (aunque lo hace a un lugar de fosforilación distinto de aquel donde se une la p60<sup>src</sup>) y a la proteína mSOS1 (a través del dominio SH3). La combinación de éstas tres proteínas se cree que podría regular la activación de las proteínas de la familia Ras (Clark y Brugge, 1995).

**-PI3 cinasa:** Es una cinasa que fosforila fosfatidilinositoles en la posición 3 del anillo de inositol. Transforma el fosfatidilinositol (4)-fosfato en fosfatidilinositol (3,4)-difosfato, y el fosfatidilinositol (4,5)-difosfato en fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato. Cuando se produce la activación de las integrinas se asocia con la FAK (Schaller, 1996), con las proteínas de la familia Src y con las proteínas del citoesqueleto. Es activada in vitro por Rho (Clark y Brugge, 1995).

**-Fosfolipasa C:** Descrita con más detalle en el capítulo primero. Es una fosfolipasa que hidroliza fosfolípidos tales como el  $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$  para rendir diacilglicerol e inositol trifosfato. La isoforma  $\gamma$  contiene dos dominios SH2 y uno SH3, y es fosforilada en restos de tirosina tras la activación de las integrinas o los receptores de los factores de crecimiento (Clark y Brugge, 1995).

**-Proteínas de la familia Ras:** Son GTPasas de bajo peso molecular. cuya activación se ha observado en linfocitos T por unión del colágeno a su receptor (Clark y Brugge, 1995).

**-Proteínas de la familia Rho:** Es otra familia de GTPasas de pequeño peso molecular íntimamente relacionada con la reorganización del citoesqueleto y la formación de fibras de tensión (Chen y cols, 1994; Symons, 1997). Se comentará más acerca de esta familia en su apartado correspondiente .

**-mSOS1:** Es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina cuya función consiste en convertir Ras-GDP inactiva en Ras-GTP activa. Es el homólogo en mamífero de la proteína SOS en *Drosophila* (Chen y cols, 1994).

**-C3G:** Es otro factor intercambiador de nucleótidos de guanina.

**-RasGAP:** Pertenece a la familia de las proteínas activadoras de GTPasas. Particularmente está relacionada con las proteínas de la familia Ras. También se ha descrito una proteína activadora de Rho denominada RhoGAP (Chen y cols, 1994).

Otras cinasas o lípidos relacionados con las rutas intracelulares activadas por las integrinas son: la fosfatidilinositol 5 cinasa (PIP-5 cinasa), la fosfolipasa A<sub>2</sub>, el ácido araquidónico o la 5-lipooxigenasa (Chen y cols, 1994).

#### Relación de las placas de adhesión focal con otras rutas intracelulares

Las integrinas y los procesos que desencadena su activación no funcionan independientemente del resto de las rutas intracelulares, sino que interacciona con estas tras la ocupación de otros receptores amplificando o reduciendo la señal de dichos receptores.

Las señales iniciadas tras la activación de las integrinas están relacionadas con los factores de crecimiento, dado que ambas rutas están implicadas en la regulación de la proliferación celular, la adhesión y la migración (McNamee y cols., 1992). También están relacionadas con las rutas intracelulares iniciadas tras la ocupación de los receptores acoplados a proteínas G de membrana (Chong y cols., 1994; Rankin y Rozengurt, 1994). Un ejemplo de

estas colaboraciones lo demuestra la activación de la formación de Ins(4,5)P<sub>2</sub>, catalizada por PIP-5 cinasa, activada por las integrinas (Chong y cols, 1994). El Ins(4,5)P<sub>2</sub> sirve de sustrato a la fosfolipasa C, activada tanto por los factores de crecimiento como por agonistas de receptores acoplados a proteínas G. Existe, por lo tanto, una relación evidente entre estas rutas, como lo demuestra el hecho de que el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el carbacol, la bombesina o la CCK-8 estimulan la fosforilación en restos de tirosina de la paxilina y la FAK (Gutkin y Robbins, 1992; Sinnet-Smith y cols., 1993; Rankin y Rozengurt, 1994; Seufferlein y cols., 1995).

La activación de las integrinas también induce un incremento en la concentración de calcio intracelular; sin embargo, la respuesta depende del tipo de integrina, del ligando y del tipo de célula (Juliano y Haskill, 1993; Leavesley y cols, 1993; Somogyi y cols, 1994). Por ejemplo, la activación de las integrinas en células acinares pancreáticas por colágeno provoca un incremento en la concentración de calcio intracelular (Somogyi y cols, 1994), y sin embargo esto no sucede en células endoteliales (Leavesley y cols, 1993).

Las áreas de estudio de la adhesión celular y de la transducción de señales iniciadas por la activación de receptores acoplados a proteínas G de membrana, o de los receptores de los factores de crecimiento poco a poco van convergiendo y ambas se han visto beneficiadas por el cruce de ideas por parte de investigadores de ambas disciplinas.

Como se ha comentado anteriormente, las placas de adhesión focal son unas regiones localizadas que relacionan la célula con la matriz extracelular, transmitiendo señales desde el exterior al interior celular y viceversa (Schwartz, 1992). Estas señales, originadas por la activación de las integrinas, dan lugar a la reorganización del citoesqueleto de actina, dando lugar a la formación de fibras de tensión que se insertan en las placas de adhesión focal. Dada la importancia que tienen los microfilamentos de actina en la respuesta celular a la activación de las integrinas y su papel esencial en la fosforilación de la FAK descrito anteriormente (Sinnnet-Smith y cols., 1993) dedicamos el siguiente apartado a su estudio dentro del marco general del citoesqueleto.

#### **4.1.2 EL CITOESQUELETO**

La capacidad de las células eucariotas para adoptar una gran variedad de formas y realizar movimientos depende del esqueleto celular o citoesqueleto; una compleja red de microfilamentos y microtúbulos que se extienden por todo el citoplasma.

El citoesqueleto es responsable de fenómenos tales como la contracción muscular o los cambios de morfología de las células embrionarias en desarrollo; también proporciona el soporte material para el desplazamiento de los distintos orgánulos citoplasmáticos de un lugar a otro del citosol (Alberts y cols., 1989). El hecho de que las bacterias carezcan de citoesqueleto ha llevado a pensar a los investigadores que la presencia de citoesqueleto en las células eucariotas podría haber sido un factor crucial en la evolución de estas células (Alberts y cols., 1989).

El citoesqueleto se compone principalmente de tres tipos de filamentos, todos ellos de naturaleza proteica: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Todos son polímeros de diferentes proteínas, pudiendo dar lugar a una gran variedad de estructuras de acuerdo con las proteínas a las que estén asociados (Alberts y cols., 1989). Los filamentos de actina se encuentran localizados tanto en las células musculares como en células no musculares (cortex celular, etc) (Bray y cols., 1986). Los microtúbulos son los responsables del movimiento ciliar, de la polaridad celular y del movimiento de los orgánulos en el citoplasma (Amos y Baker, 1979). Los filamentos intermedios se localizan alrededor de la membrana nuclear (Alberts y cols., 1989).

#### ***4.1.2.1. FILAMENTOS DE ACTINA***

La actina es una proteína globular (actina G) que se ensambla para dar lugar a formaciones filamentosas (actina F). Es la proteína más abundante en la mayoría de las células eucariotas. Constituye más del 5% del total de las proteínas celulares (Bray y cols., 1986).

Los filamentos de actina son especialmente importantes en las células musculares. La contracción es el tipo de movimiento mejor estudiado. Está mediada por un sofisticado aparato intracelular presente de una forma más o menos rudimentaria en casi todas las células eucariotas. (Amos, 1985). En esta maquinaria intervienen filamentos de actina, filamentos de miosina sobre los que se deslizan los anteriores y una serie de proteínas asociadas que colaboran en este proceso, estas proteínas son: la tropomiosina y las troponinas C, I y T (Amos, 1985). Dado que las células acinares no poseen una estructura contractil definida no profundizaremos más en este tema pasando a continuación a estudiar aquellas estructuras celulares compuestas por filamentos de actina (Amos, 1985).

#### ***El cortex celular***

La actina se encuentra distribuida por todo el citoplasma, sin embargo, en la mayoría de las células animales existe una densa red de filamentos de actina y otras proteínas asociadas localizada inmediatamente bajo la membrana plasmática. Esta estructura recibe el nombre de

cortex celular. El cortex celular confiere fuerza mecánica a la superficie de la célula y la capacidad para cambiar su forma o moverse (Bray y cols., 1986).

La forma del cortex celular varía de una célula a otra, o de una región a otra dentro de la misma célula. En unos casos es una red tridimensional de filamentos de actina entrecruzados, en otros casos son finas láminas y en ocasiones forman estructuras hacia el exterior dando lugar a prolongaciones de la superficie celular (Bray y cols., 1986).

Otras estructuras formadas por filamentos de actina.

En las células no musculares a menudo se forman, para realizar una función concreta, estructuras contráctiles compuestas por filamentos de actina y miosina que desaparecen cuando la acción se ha llevado a cabo. Este es el caso de los **anillos contráctiles**, unas estructuras que se forman bajo la membrana plasmática durante la división celular. La tensión que genera este anillo constriñe la célula en división por la línea ecuatorial dirigiendo la separación de las dos células hijas (Schroeder, 1973).

Otro ejemplo de las formaciones contráctiles temporales de actina y miosina son las **fibras de estrés** o **fibras de tensión**. Las fibras de tensión son muy evidentes en los fibroblastos en cultivo. Uno de los extremos de dichas fibras se inserta en unas localizaciones especiales de la membrana plasmática, las placas de adhesión focal, el otro extremo de las fibras de tensión se inserta o bien en los filamentos intermedios que rodean al núcleo o en una segunda placa de adhesión focal (Byers y Fujiwara, 1982). Las fibras de tensión tienen muchas de las proteínas contractiles encontradas en las células musculares, incluyendo la actina y la miosina II, que se organizan de modo similar a los sarcómeros (Kreis y Birchmeier, 1980). Aunque la organización de las fibras de tensión sugiere una función contractil en la célula, raramente se produce un acortamiento de estas fibras en células vivas (Kreis y Birchmeier, 1980). Se ha sugerido que las fibras de tensión presentan una contracción isométrica y que esta tensión isométrica generada contribuye a su propio ensamblaje (Burrige, 1981). Las fibras de tensión se forman en respuesta a la tensión generada en la célula por estímulos externos, transmitida por la adhesión de la célula a la matriz extracelular y desaparecen durante la división celular, momento durante el cual la célula pierde sus adherencias al sustrato que la rodea (Byers y Fujiwara, 1982). También se ha comprobado que la ruptura de uno de los anclajes de las fibras de tensión provoca la rápida desintegración de la misma (Byers y Fujiwara, 1982). Se cree que las fibras de tensión se contraen para permitir a las células ejercer tensiones sobre la matriz extracelular que la rodea. Este fenómeno es particularmente importante en la morfogénesis y en la motilidad celular (Byers y Fujiwara, 1982)



No todas las formaciones contráctiles compuestas por filamentos de actina en las células no musculares son transitorias. Los cinturones de adhesión, que existen en la región apical de las células epiteliales y que permiten la fijación de unas células a otras manteniendo un orden, son más duraderos (Alberts y cols., 1989).

Aproximadamente el 50% de las moléculas de actina están sin polimerizar en la mayoría de las células animales, encontrándose o bien monómeros libres o bien formando complejos con otras proteínas. Existe un equilibrio dinámico entre el pool de moléculas de actina sin polimerizar y los filamentos de actina. Este equilibrio ayuda a la coordinación de muchos movimientos de la superficie celular y es esencial para la rápida reorganización de los microfilamentos de actina (Korn, 1982).

#### **4.1.2.2. MICROTUBULOS**

Los microtúbulos son unas formaciones filamentosas constituidas por moléculas de tubulina. Cada molécula de tubulina es un heterodímero constituido por dos subunidades globulares:  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina. La tubulina está presente en la célula en menor cantidad que la actina. Estos túbulos son los de mayor diámetro de cuantos constituyen el citoesqueleto. Cuando las dos moléculas de tubulina se ensamblan forman protofilamentos con la subunidad  $\beta$ -tubulina de una molécula de tubulina en contacto con la subunidad  $\alpha$ -tubulina de la molécula siguiente. Cada microtúbulo está formado por 13 protofilamentos, alineados en paralelo, que dejan un hueco central aparentemente vacío (Amos y Baker, 1979).

Los microtúbulos se encuentran en una disposición radial en la célula, iniciándose en una localización cercana al núcleo y ofreciendo un sistema de fibras que sirven de soporte para el transporte de vesículas y otros orgánulos citoplasmáticos. Los microtúbulos también pueden participar en dar una polaridad a la célula y en regular la forma, el movimiento y el plano de división celular (Amos y Baker, 1979). Los microtúbulos juegan un papel muy importante en el transporte de sustancias de una parte a otra del citoplasma (Allen, 1987). La más clara demostración de este hecho es el papel de los microtúbulos en el transporte axonal en las neuronas. En dichas células se produce un rápido transporte de vesículas en ambas direcciones a lo largo del axón, entre el cuerpo neuronal y la terminación nerviosa.

La colchicina, un alcaloide obtenido del *Colchicum autumnale*, es capaz de inhibir la polimerización de los microtúbulos. Cada molécula de colchicina se une débilmente a una molécula de tubulina evitando su polimerización (Salmon y cols., 1984). Otras drogas como el taxol tienen el efecto opuesto, es decir, se unen ligeramente a los microtúbulos estabilizándolos y causando la polimerización de las moléculas de tubulina libres (De Brabander y cols., 1986).

Existen una proteínas denominadas "proteínas asociadas a los microtúbulos" (MAP) que estabilizan la estructura polimerizada de los microtúbulos y median su interacción con otros componentes celulares (Olmsted, 1986). Se han identificado diferentes tipos de MAPs; en general, uno de los extremos de estas proteínas se unen a los microtúbulos mientras que el otro se une a otros componentes celulares. Un tipo especial de MAP, la kinesina, es una ATPasa que usa la energía de la hidrólisis del ATP para mover vesículas unidireccionalmente a lo largo del microtúbulo. Generalmente este movimiento es hacia la periferia de la célula, en tanto que otra MAP, la dineína, realiza el movimiento contrario (Vale y cols., 1985). Actualmente se ha observado que el retículo endoplasmico es transportado por la kinesina hacia la periferia celular, en tanto que las vesículas del aparato de Golgi son conducidas hacia el centro de la célula, cerca del centrosoma, en un movimiento que podría ser producido por la dineína (Allan y Kreis, 1986).

#### **4.1.2.3. FILAMENTOS INTERMEDIOS**

Son polímeros fibrosos a modo de cuerdas, descritos inicialmente en las células musculares, que se cree tienen un papel estructural muy importante en la célula. Su estructura, a modo de cuerdas trenzadas, presenta típicamente un diámetro entre 8 y 10 nm, intermedio entre el diámetro de los filamentos de actina (los más finos) y de los microtúbulos (Geiger, 1987). En las células animales los filamentos intermedios forman una especie de red o canasta alrededor del núcleo, extendiéndose desde aquí hacia la periferia celular (Alberts y cols., 1989).

Los filamentos intermedios están formados por cuatro tipos de polipéptidos que se clasifican por su secuencia de aminoácidos en cuatro categorías (Osborn y Weber, 1983; Geiger, 1987):

*Tipo I:* Se localizan principalmente en las células epiteliales. Incluyen dos subfamilias de queratinas: queratinas de carácter ácido y queratinas de carácter básico o neutro. La queratina es una de las proteínas más complejas que existe en la naturaleza, solamente en los epitelios humanos existen más de 19 tipos diferentes, sin contar 8 tipos más en el pelo y las uñas (Osborn y Weber, 1983).

*Tipo II:* Están formados por tres tipos de proteínas: vimentina (53KDa), desmina (52KDa) y unas proteínas gliales fibrilares de carácter ácido (45KDa). La vimentina está ampliamente distribuida en células de origen mesenquimatoso, incluyendo fibroblastos, células endoteliales y leucocitos. La desmina se localiza tanto en el músculo liso como en el estriado. Las proteínas gliales fibrilares forman filamentos en las células de la glía (astrocitos y algunas células de Schwann) en el sistema nervioso (Osborn y Weber, 1983).

*Tipo III:* Está constituido por un tipo de proteínas especiales que por su localización se denominan proteínas neurofilamentosas. Estas proteínas dan lugar a la formación de neurofilamentos en axones y dendritas (Osborn y Weber, 1983; Geiger, 1987).

*Tipo IV:* Formado por proteínas que dan lugar a la lámina nuclear, estructura compuesta por una red de filamentos intermedios que rodea la superficie nuclear desorganizándose en los estados de mitosis (Osborn y Weber, 1983; Geiger, 1987).

Las células pueden regular el número, la longitud y la posición de los filamentos intermedios que contienen; esto indica que pueden controlar el ensamblaje y desensamblaje de estos filamentos. Un factor importante en este control es la fosforilación de residuos específicos en estas proteínas. Por ejemplo, la vimentina existe tanto en estado fosforilado como no fosforilado. Si los filamentos de vimentina son fosforilados por las proteínas cinasas se desensamblan en unidades más pequeñas. Por lo tanto la fosforilación es un proceso muy importante en el proceso de formación y destrucción de estos filamentos y por lo tanto de las redes que forman (Geisler y Weber, 1988).

La función de los filamentos intermedios parece ser proporcionar un soporte mecánico a la célula y su núcleo. En el caso de las células epiteliales, los filamentos intermedios forman una red transcelular que parece diseñada para resistir fuerzas externas. Los neurofilamentos en los axones probablemente sean los responsables de la resistencia de estos a los movimientos del animal. Los filamentos formados por desmina proporcionan un soporte mecánico a los sarcómeros y la vimentina rodea, y probablemente también soporta, las gruesas gotas de grasa en las células adiposas (Alberts y cols., 1989).

Existen unas regiones, denominadas "regiones variables", en los filamentos que determinan no solo su asociación con otros filamentos intermedios sino con otros componentes celulares tales como microtúbulos o la membrana plasmática. Estas regiones variables de las proteínas que componen los filamentos intermedios podrían ejercer una función similar a la de las proteínas accesorias de los filamentos de actina y de los microtúbulos, con la salvedad de que en el primer caso están covalentemente unidas a las subunidades de estos filamentos intermedios, en lugar de ser una proteína independiente (Alberts y cols., 1989).

El citoesqueleto de las células acinares pancreáticas está compuesto por las tres clases de filamentos descritos con anterioridad. Estos filamentos se localizan principalmente próximo al complejo de Golgi y en la región apical de la célula (Gorelick y Jamieson, 1994). Los filamentos de actina constituyen una red que se localiza inmediatamente debajo de la membrana plasmática, ocupando en la célula en reposo toda la zona apical, impidiendo el contacto de orgánulos con la

membrana (Gorelick y Jamieson, 1994). Los filamentos de actina también forma estructuras paralelas que se extienden desde los microvilli hacia el interior, rodeando en ocasiones los gránulos de zimógeno (Gorelick y Jamieson, 1994). Los filamentos intermedios, aunque en estas células están dispersos por el citoplasma, se concentran en las inmediaciones de los desmosomas (Gorelick y Jamieson, 1994). Los microtúbulos forman en las células acinares pancreáticas una estructura a modo de cesta en el polo basal de la célula (Gorelick y Jamieson, 1994).

Cuando la célula acinar se estimula para secretar, la red apical de microfilamentos que se localiza bajo la membrana sufre una clara reducción, permitiendo a los gránulos de zimógeno que se aproximen a la membrana (O'konski y Pandol, 1990). Sin embargo, cuando la célula se estimula con concentraciones supramáximas de algunos secretagogos, como la CCK o el carbacol, los microvilli y la red apical de filamentos de actina desaparecen (O'konski y Pandol, 1990). Bajo estas condiciones, algunas estructuras que normalmente no se localizan en la zona apical, como el retículo endoplásmico o los lisosomas, pueden desplazarse hasta esta región. Como veremos más adelante, estos cambios en el citoesqueleto de la región apical puede estar relacionado con la inhibición de la secreción observada al estimular la célula con concentraciones supramáximas de CCK o carbacol. Por otro lado, parece necesario un citoesqueleto intacto en la región apical para mantener la polaridad celular y permitir un proceso de exocitosis normal (Gorelick y Jamieson, 1994).

### ***ORGANIZACIÓN Y FUNCIONES DEL CITOESQUELETO***

En el apartado anterior se estudiaron los principales elementos del citoesqueleto, filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, como entes independientes en la célula; sin embargo, las diferentes piezas de este puzzle deben encajar adecuadamente, relacionándose con los demás elementos del citoesqueleto y coordinando sus funciones en orden a realizar diferentes funciones: mediar cambios de la morfología celular, producir diferentes movimientos, tanto celulares como de los orgánulos citoplasmáticos, proporcionar resistencia mecánica, etc.

En el citoplasma existe una espesa red de filamentos constituida por los tres tipos descritos en el apartado anterior, estos filamentos se encuentran relacionados entre sí y a una serie de proteínas accesorias, que participan coordinando la labor del citoesqueleto. Toda esta maraña de filamentos, no constituye, por lo tanto, un elemento inerte en la célula sino que está completamente organizada para llevar a cabo su función. (Bridgman y Reese, 1984).

Dado que las células acinares pancreáticas no son células cuya función principal sea la de migrar por el organismo, como es el caso de las células defensivas o aquellas células

pluripotenciales como los fibroblastos, no profundizaremos en este tema. Sin embargo algunos aspectos si es adecuado comentarlos para entender la importancia del citoesqueleto en la fisiología celular. El citoesqueleto es el responsable de la migración celular. Sin embargo, el movimiento de la célula requiere que esta tenga una cierta polaridad, es decir, que muestre una única dirección de movimiento. Así, la membrana celular se encuentra inalterada en toda su superficie excepto en aquel borde que indica su dirección de migración, que proyectará prolongaciones centrífugas que marcan el movimiento (Kolega, 1986). Cuando la célula migra los microtúbulos y los microfilamentos de actina trabajan conjuntamente, por lo que es difícil discernir entre el papel de cada uno de ellos (Malawista y De Boisflury Chevance, 1982).

El citoesqueleto participa de dos formas diferentes en la generación del movimiento una vez se ha establecido su dirección (Bray y White, 1988):

1. Uno de estos motores que proporcionan el movimiento celular lo constituyen los filamentos de actina en el cortex celular. Estos filamentos promueven la extensión de prolongaciones de la membrana celular en la dirección del movimiento y generan la tensión cortical en el resto de la superficie celular.

2. El otro mecanismo para generar el movimiento se basa en la polarización del transporte de vesículas recicladas pertenecientes al ciclo endocítico. El ciclo endocítico es un mecanismo fisiológico por el que la célula internaliza, continuamente, pequeñas porciones de la membrana celular, retornandolas posteriormente de nuevo a la superficie. Este fenómeno forma parte de un continuo proceso de renovación y reciclaje celular. En las células en migración el retorno de estas pequeñas vesículas a la superficie es guiada por los microtúbulos, los microfilamentos de actina o ambos, hacia el borde en expansión, que marca la dirección del movimiento.

Además de su papel en la migración celular, los microtúbulos juegan un papel crucial en el control de la forma celular. En general, las células eucariotas tienen muy distinta morfología, en unos casos debido a sus características externas (presencia de cilios, etc) y en otros casos por la posición de sus orgánulos celulares.(Alberts y cols., 1989).

El citoesqueleto de una célula puede influir en sus células vecinas. Esta forma de comunicación intercelular se cree que juega un papel fundamental en la determinación de la morfología de los diferentes órganos y tejidos de los animales (Lackie, 1986). Un mecanismo por el cual el citoesqueleto de una célula puede influir en sus células vecinas está relacionado con la relación entre el citoesqueleto de una célula y la matriz extracelular que esta secreta. Una célula que tiene orientado su citoesqueleto, tiende a secretar una, igualmente orientada, matriz

extracelular, esta puede influir en la orientación del citoesqueleto de aquellas células que estén en contacto con ella (Lackie, 1986). El hecho de que, bien por de las uniones celulares o de la matriz extracelular por las placas de adhesión focal, las células que forman un tejido puedan coordinar la organización de sus citoesqueletos es muy importante para crear el patrón de organización de todo un tejido (Alberts y cols., 1989).

Finalmente comentar que hoy en día no hay ninguna duda del papel central del citoesqueleto en el desarrollo del organismo animal, y dentro del mismo, en la génesis de la morfología de los diferentes tejidos. La complejidad de la morfología y el orden de las células en los tejidos depende de las proteínas del citoesqueleto y de su estructuración individual y colectiva. A menudo los microtúbulos son los responsables de guiar los movimientos morfogenéticos. En otros casos los filamentos de actina son los responsables de desempeñar la función principal (Alberts y cols., 1989).

Otra de las funciones importantes del citoesqueleto es la participación en los procesos secretores. Uno de los fenómenos que preceden a la exocitosis es el transporte de gránulos de secreción hacia la membrana, proceso en el que interviene el citoesqueleto (Chang y Jamieson, 1989). También es necesaria una alteración del cortex celular en aquella zona donde se produce la exocitosis. En el capítulo siguiente, se estudiará más profundamente la participación del citoesqueleto en la secreción celular.

Como se ha comentado anteriormente, el citoesqueleto está relacionado con las placas de adhesión focal. Cuando se constituye una placa de adhesión las fibras de estrés de actina toman contacto con ellas, el extremo de estas fibras de estrés está recubierto por unas proteínas denominadas proteínas bloqueantes o capping proteins, que bloquean el proceso de prolongación de los filamentos de actina (Clark y Brugge, 1995). Por las placas de adhesión focal se transmiten señales desde la matriz extracelular a la célula, bien por el citoesqueleto, o por la activación de otras rutas intracelulares de acoplamiento estímulo-secreción. Se sabe que la fosforilación de la FAK en residuos de tirosina, tras la unión de un ligando de la matriz extracelular a las integrinas, es un fenómeno necesario para el ensamblaje y la puesta en funcionamiento de las placas de adhesión focal, (Parsons y cols, 1994), y por lo tanto, para que la señal pueda ser transmitida desde la matriz extracelular al citoesqueleto, pero ¿cómo afecta el citoesqueleto al proceso de fosforilación de la FAK?

Diversos autores han comprobado que la estimulación de receptores acoplados a proteínas G de membrana por neuropéptidos, tales como la bombesina y la endotelina, produce la fosforilación de la p125<sup>FAK</sup> y la paxilina en restos de tirosina en fibroblastos 3T3 (Zachary y cols, 1992; Zachary y cols, 1993). Estudios recientes (Zachary y cols, 1993) utilizando

citocalasina D, un agente micógeno que causa la despolimerización de los filamentos de actina (Katagiri y Matsuura, 1971), han puesto de manifiesto que la fosforilación en restos de tirosina de la p125<sup>FAK</sup> y la paxilina estimulada por bombesina, en fibroblastos 3T3, depende de la existencia de un citoesqueleto de actina íntegro.

La relación entre la FAK y el citoesqueleto es aún más compleja. Algunos autores (Ridley y Hall, 1992) han demostrado que la proteína p21 Rho participa en la formación de las placas de adhesión focal, por tanto en la activación de la FAK. Por otro lado otros autores han indicado que la ruta de la fosfolipasa C y de las proteínas de la familia Rho podrían cooperar para regular la reorganización de los microfilamentos de actina, (Takai y cols, 1995). La ADP-ribosilación e inactivación de Rho mediante el tratamiento con la exoenzima C3 (Sekine y cols., 1989) reduce notablemente la formación de fibras de estrés estimulada por bombesina y paralelamente reduce la fosforilación de la FAK en restos de tirosina.

En resumen, parece evidente que existe una íntima relación entre la FAK, el citoesqueleto y Rho (Takai y cols., 1995). La fosforilación de la FAK en un residuo de tirosina puede estar motivada por, entre otros fenómenos, la unión de las integrinas a un componente de la matriz extracelular o por la activación de los receptores unidos a proteínas G de membrana de algunos neuropéptidos, como la bombesina o la endotelina. Este segundo mecanismo es totalmente dependiente del citoesqueleto de actina y depende en cierta medida de la funcionalidad de Rho, proteína íntimamente relacionada con el citoesqueleto de actina (Sinnott-Smith y cols., 1993; Parsons y cols, 1994; Rozengurt, 1995).

Quizás la señal iniciada tras la ocupación de los receptores de membrana acoplados a proteínas G se transmita a la FAK a través del citoesqueleto de actina y entonces se produzca su fosforilación. Este proceso podría activar la formación de una placa de adhesión en sentido inverso, es decir, desde el interior, con objeto de transmitir una señal a la matriz extracelular y a las células vecinas, para así coordinar la función de todo un conjunto de células (Parsons y cols., 1994). Existen todavía muchas áreas sin explorar en el campo de la comunicación intra e intercelular, poco a poco se van contestando preguntas que ocasionan el planteamiento de nuevas cuestiones, constituyendo el proceso lógico y necesario del avance en el estudio de los mecanismos de acoplamiento estímulo-respuesta en los diferentes sistemas celulares.

#### **4.1.3. FAMILIA DE GTPASAS DE BAJO PESO MOLECULAR RHO**

Una de las familias de proteínas que participa más activamente en el control de la reorganización del citoesqueleto y la formación de placas de adhesión focal son las Rho GTPasas. Las Rho GTPasas constituyen un subgrupo dentro de la superfamilia de las GTPasas de bajo peso molecular de la familia Ras. Se conocen al menos once miembros de esta familia en mamíferos, los cuales, se subdividen en cinco grupos en base a su secuencia de aminoácidos y a las diferencias funcionales: grupo 1, compuesto por Rho A, Rho B y Rho C; grupo 2: Rac 1, Rac 2 y Rho G; grupo 3: Cdc42 y TC10; grupo 4: Rho D y grupo 5: Rho E y TTF (Symons, 1997). Además de estas se han identificado otras muchos homólogos en organismos inferiores, como las levaduras o la mosca de la fruta (Symons, 1997).

Rho contiene en su estructura una secuencia de aminoácidos que es responsable de la unión de GTP o GDP, así como de la actividad GTPasa; dicha secuencia de aminoácidos está muy conservada en todas las proteínas que unen GTP. La secuencia de aminoácidos entre el residuo 34 y 42 de Rho se corresponde con el dominio de la molécula en el que actúan las proteínas de la familia Ras (Takai y cols, 1995).

Las proteínas de la familia de las Rho GTPasas funcionan como interruptores celulares, teniendo dos estados de actividad: activadas cuando están unidas a GTP, e inactivas cuando están unidas a GDP. El paso del estado activo al inactivo y viceversa está controlado por tres proteínas reguladoras: factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), que activan Rho al catalizar su disociación del GDP. El segundo tipo de proteínas reguladoras de Rho son las GAPs, que aceleran la actividad GTPasa de Rho, y por lo tanto actúan como reguladores negativos. Por último, existen unos factores inhibidores de la disociación de GDP (GDIs), cuya función también es inhibidora (Symons, 1996; Symons, 1997).

Rho sufre fenómenos de interconversión entre la forma activa (unida a GTP) y la forma inactiva (unida a GDP), como se ha indicado anteriormente el paso de la forma inactiva a la activa está controlado por factores como los GEF y las GAP. Hasta la fecha se han identificado diferentes tipos de GEFs: Smg-GDS (61 KDa), Dbl (108 KDa), Ost (98 KDa), p115-GEF y Lbc. También se han identificado dos tipos de GAPs: p50GAP (50 KDa) y p190GAP (190 KDa) (Takai y cols, 1995; Hart y cols, 1996).

Aunque el mecanismo preciso de activación de la proteína Rho no ha sido descrito completamente, algunos autores (Takai y cols, 1995) han descrito un modelo de activación de dicha proteína. Según este modelo, Rho se encontraría en el citoplasma inicialmente unida a



GDP, es decir, en la forma inactiva, formando complejo con la Rho-GDI. La activación de Rho puede tener lugar por dos posibles mecanismos (Takai y cols, 1995):

- GDP-Rho inicialmente se disocia de Rho-GDI y entonces es activada por uno de los factores GEF que conseguiría activar a Rho, es decir, quedaría unida a GTP.

- GDP-Rho sería activado directamente por los factores GEF, sin necesidad de separarse de Rho-GDI, terminando el proceso en la activación de Rho.

Una vez que la molécula de Rho es activada, se une a su molécula diana, este proceso puede ser facilitado por uno de los factores GEF. Cuando Rho ha cumplido su función es de nuevo convertido a la forma inactiva (GDP-Rho) por la proteína p190Rho-GAP, formando de nuevo complejo con la proteína Rho-GDI (Takai y cols, 1995).

Estudios de biología celular han demostrado que Rho participa en una gran cantidad de funciones celulares y cada día se le atribuyen más, una de las funciones principales es la regulación del citoesqueleto y de la formación de las placas de adhesión focal, que se describirá más profundamente en el siguiente apartado. Además de esta función las proteínas de la familia Rho también desempeñan un papel importante en la proliferación celular (Symons, 1996). Se ha comprobado que Rho se encuentra ubicada en las vías intracelulares activadas por las Ras, si están directamente relacionadas con Ras como las proteínas Raf, MEK o MAP cinasas, o únicamente median el efecto de las Ras, es algo que todavía se desconoce (Symons, 1997).

Las GTPasas de la familia Rho también participan en la progresión del ciclo celular. Así, la inhibición de Rho por la exoenzima C3, una ADP ribosiltransferasa de *Clostridium botulinum*, inhibe la síntesis de ADN estimulada por suero (Olson y cols., 1995). Rho también participa en la regulación de la transcripción, siendo esta una posible explicación para la participación de las GTPasas en el control del crecimiento (Olson y cols., 1995).

El efecto de Rho en la biología celular está inducido por diferentes señales extracelulares donde están implicados los receptores acoplados a las proteínas G de membrana o con actividad tirosina cinasa. Una de las proteínas implicadas es la proteína cinasa C, activada a través de la fosfolipasa  $C\beta$  o  $\gamma$  (Takai y cols, 1995).

La cascada de señales que media el efecto de las GTPasas de la familia Rho no se ha identificado aún (Symons, 1996). Diferentes estudios han demostrado que la proteína Cdc 42, que se activa tras la ocupación de receptores de membrana acoplados a proteínas G, produce la activación de las Jun amino terminal cinasas (JNK), de la GTPasa Rac y de la MAP cinasa p38 (Coso y cols., 1995; Olson y cols., 1995). Las Rac, que son activadas por la PI3-cinasa, las Ras

y la proteína Cdc 42, activan a las JNK, una tirosina cinasa asociada a las GTPasas de bajo peso molecular (PAK) y la PLA<sub>2</sub> lo que conlleva a la activación de Rho (Coso y cols., 1995; Olson y cols., 1995; Symons, 1996). Por último, Rho, que es activada por la PLA<sub>2</sub> y posiblemente por otras fosfolipasas, y es regulada por la PI3-cinasa, activa un gran número de proteínas, entre ellas la activación de la PI3-cinasa, de la PI5-cinasa, de la fosfolipasa D, de la proteína cinasa N, de la proteína cinasa asociada a Rho (ROK) y posiblemente de las MAP cinasas (Leung y cols., 1995; Symons, 1996; Watanabe y cols., 1996).

#### **4.1.4. REGULACION DE LA FORMACIÓN DE LAS PLACAS DE ADHESION FOCAL Y LAS FIBRAS DE TENSION DE ACTINA**

Las placas de adhesión focal y el citoesqueleto se encuentran íntimamente relacionados ya que muchos de los elementos que componen dichas placas son proteínas pertenecientes al citoesqueleto, como la paxilina, la talina o la actina, y al mismo tiempo las placas reorganizan la formación de fibras de tensión de actina. Por esta razón, parece lógico estudiar conjuntamente la regulación de la organización del citoesqueleto y de la formación de fibras de tensión.

Las observaciones llevadas a cabo por muchos autores indicaron que incrementos en la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas asociadas a las placas de adhesión focal, en respuesta a la activación de las integrinas, ocasiona la reorganización del citoesqueleto. La FAK, en virtud de su localización en las placas de adhesión, representa el primer candidato para llevar a cabo la regulación tanto de la constitución de las placas de adhesión, como de la formación de fibras de tensión de actina (Schaller y cols., 1992). Este fenómeno se ha observado en la mayoría de los modelos celulares donde se ha estudiado (Schaller, 1996); sin embargo, en células musculares de aorta de ratón se ha observado que la FAK no participa en el ensamblaje de las fibras de tensión a las placas de adhesión (Wilson y cols., 1995). Por tanto, no está clara la participación de la FAK en la formación de las placas de adhesión focal, como lo demuestran estudios realizados por Defilippi y cols. (1997) que demuestran que la activación de la FAK no provoca *per se* la constitución de las placas de adhesión. Sin embargo, si parece necesaria la activación de la PKC y de Rho para la formación de las placas de adhesión y las fibras de tensión (Defilippi y cols., 1997). Estudios realizados por Dash y cols. en 1995, en plaquetas, han demostrado que la asociación de la FAK y otras proteínas como la p60<sup>src</sup>, y las GTPasas Cdc42 y Rap1 con el citoesqueleto es un proceso reversible que está directamente regulado por la concentración de calcio intracelular.

La defosforilación de proteínas también participa en la regulación del citoesqueleto. Así, la fosfatasa microcistina-LR produce una desorganización de los filamentos intermedios (queratinas 8 y 18) y de la red de filamentos de actina en hepatocitos. Estos estudios apuntan a que las interacciones entre los filamentos intermedios, los microfilamentos de actina y otros componentes celulares depende del equilibrio fosforilación/defosforilación de proteínas intracelulares (Toivola y cols., 1997).

Existen agonistas que tienen efectos en la reestructuración del citoesqueleto, este es el caso de la CCK y la endotelina. Se ha descrito que la ceruleína, análogo de la CCK, a dosis supramáximas causa modificaciones en el citoesqueleto de la región apical en células acinares pancreáticas, entre los que se incluyen ablación de los microvilli y alteración del citoesqueleto de actina. Estas modificaciones en el citoesqueleto de la región apical de la célula podría estar relacionada con una disminución de la secreción de amilasas (O'Konski y Pandol, 1990; O'Konski y Pandol, 1993; Jungermann y cols., 1995). El JMV-180, agonista parcial de la CCK que no presenta inhibición supramáxima en la secreción de amilasas, protege el citoesqueleto de los cambios ocasionados por la ceruleína a dosis supramáximas (O'Konski y Pandol, 1993). Estudios más recientes han demostrado que las modificaciones producidas por la ceruleína incluyen la progresiva desorganización de los microtúbulos y los microfilamentos de actina. Estas alteraciones explican la alteración en el transporte de vesículas y la exocitosis de enzimas digestivas (Jungermann y cols., 1995). Estudios llevados a cabo por Muallen y cols. (1995) en células acinares pancreáticas han sugerido que los filamentos de actina de la región apical de la célula actúan como bloqueantes de la exocitosis; sin embargo, para que se lleve a cabo un proceso normal de exocitosis es necesaria una mínima estructuración del citoesqueleto de la región apical, ya que la despolimerización de los filamentos de actina con faloidina inhibe la exocitosis (Muallen y cols., 1995). Las endotelinas, una familia de potentes vasoconstrictores, provoca la reorganización del citoesqueleto y la formación de fibras de tensión de actina en astrocitos, induciendo la expansión del citoplasma de estas células (Koyama y Baba, 1994). La microinyección de la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* bloqueó la formación de fibras de tensión estimulada por las endotelinas (Koyama y Baba, 1996).

Desde su descubrimiento se pensó que las proteínas de la familia Rho estaban implicadas en la reorganización del citoesqueleto. Symons en 1996 describió que Rho dirigía la formación de fibras de tensión, Cdc42 controla la filipodia y Rac regula la lamelipodia en fibroblastos estimulados con ácido lisofosfatídico. Las proteínas de la familia Rho también regulan otras modificaciones del citoesqueleto como son la formación de adhesiones celulares en células epiteliales polarizadas y el crecimiento axonal (Symons, 1997).

No está muy claro la forma en que Rho lleva a cabo la regulación del citoesqueleto; no obstante, se ha descubierto una cinasa (ROK) como un sustrato de Rho que participa en la regulación de la formación de fibras de tensión (Leung y cols., 1996).

Se ha observado que en el proceso de reorganización del citoesqueleto es necesaria tanto la acumulación de actina polimerizada como la formación de placas de adhesión focal (Symons, 1997). Recientemente se ha avanzado bastante en el estudio del mecanismo por el cual Rho controla la polimerización de la actina. Así, se ha descubierto que la proteína Rac, vía activación de la síntesis de PI(4,5)P<sub>2</sub>, es capaz de retirar las proteínas bloqueantes del extremo de los filamentos de actina, permitiendo su polimerización (Hartwitz y cols., 1995). Cdc 42 y Rho también estimulan la producción de inosítoles polifosfato y podrían controlar la extensión de los filamentos de actina por un mecanismo similar al utilizado por la Rac (Symons, 1997). Se ha descrito un mediador para la señal inducida por la Cdc 42, la proteína implicada en el síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP). La sobreexpresión de la WASP induce la polimerización ectópica de actina de forma dependiente de la activación de Cdc 42 (Symons y cols., 1996).

Tomando en consideración los trabajos científicos publicados hasta el momento actual y que han sido revisados, planteamos el estudio experimental presentado en este capítulo con los siguientes **OBJETIVOS**:

1. Determinar si la fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas FAK y paxilina en respuesta al carbacol y la CCK requiere el mantenimiento de la organización del citoesqueleto en células acinares pancreáticas de rata.

2. Determinar si la GTPasa de bajo peso molecular Rho está implicada en la fosforilación en residuos de tirosina de la tirosina cinasa FAK y la proteína paxilina tras la estimulación de receptores acoplados a proteínas G de membrana.

## **4.2. METODOLOGÍA**

### **4.2.1 ANIMALES Y PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS**

Los animales, su calidad biológica, su preparación y manejo previo a la realización de los experimentos, y la técnica empleada para obtener la suspensión acinar se describen en el capítulo II, "Metodología general", apartados 2 y 3 respectivamente.

### **4.2.2 METODOLOGÍA PARA DETERMINAR LA FOSFORILACIÓN DE LA FAK Y LA PAXILINA EN RESIDUOS DE TIROSINA**

El método empleado para determinar la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es el Western Blotting, descrito con mayor profundidad en capítulo II.

El protocolo seguido para la realización de la inmunoprecipitación y el inmunoblotting en este capítulo es el descrito previamente en el capítulo anterior.

### **4.3. RESULTADOS**

#### **4.3.1. IMPLICACIÓN DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA EN LA FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS DE TIROSINA DE LA FAK Y LA PAXILINA.**

Con objeto de examinar el papel de los microfilamentos de actina en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina observada en respuesta al carbacol o la CCK-8, tratamos células acinares pancreáticas de rata con citocalasina D. La citocalasina D es un agente micógeno, producido por *Zigosporium mansonii*, que causa la despolimerización de los filamentos de actina (Katagiri y Matsuura, 1971).

La incubación de la suspensión de células acinares con citocalasina D (3 $\mu$ M) durante 2 horas, a 37°C, causó una notable inhibición de la tasa de fosforilación basal en residuos de tirosina tanto de la FAK como de la paxilina (figura 32).

El tratamiento de las células acinares pancreáticas de rata con citocalasina D (3 $\mu$ M), durante 2 horas, inhibió totalmente la fosforilación en residuos de tirosina tanto de la p125<sup>FAK</sup> como de la paxilina, estimulada por carbacol (1 $\mu$ M) y CCK-8 (0,1nM) (figura 32).

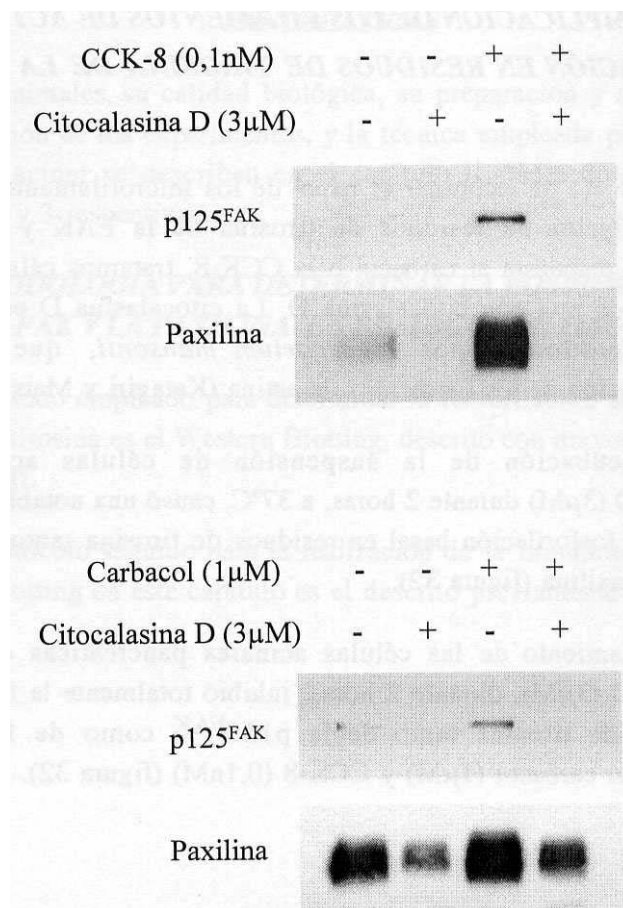


FIGURA 32. Efecto de la incubación durante 2 horas con **citocalasina D** (3μM) en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por **CCK-8** (0,1nM) y **carbacol** (1μM) en acinos pancreáticos de rata. En la figura se muestra un experimento representativo de otros 4.

#### 4.3.2. IMPLICACIÓN DE LOS MICROTÚBULOS EN LA FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS DE TIROSINA DE LA FAK Y LA PAXILINA.

Para estudiar la implicación de los microtúbulos en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y de la paxilina, estimulada por la CCK-8 o por carbacol, tratamos células acinares pancreáticas de rata con colchicina. La colchicina es un alcaloide producido por el hongo *Colchicum autumnale*, que inhibe la polimerización de las moléculas de tubulina, componente esencial de los microtúbulos, ya que cada molécula de colchicina se une debilmente a una molécula de tubulina evitando de este modo su polimerización (Salmon y cols., 1984).

Con objeto de desorganizar la red de microtúbulos citoplasmáticos, los acinos pancreáticos de rata fueron incubados durante 2 horas, a 37°C, con colchicina a la concentración

0,3 $\mu$ M. Este tratamiento, por sí mismo, no produjo modificación alguna en la tasa de fosforilación no estimulada de las proteínas objeto de estudio.

El pretratamiento de las células acinares pancreáticas con colchicina a la concentración 0,3 $\mu$ M no modificó la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK ni de la paxilina estimulada por CCK-8 (0,1nM) y carbacol (1 $\mu$ M) (ver figura 33).

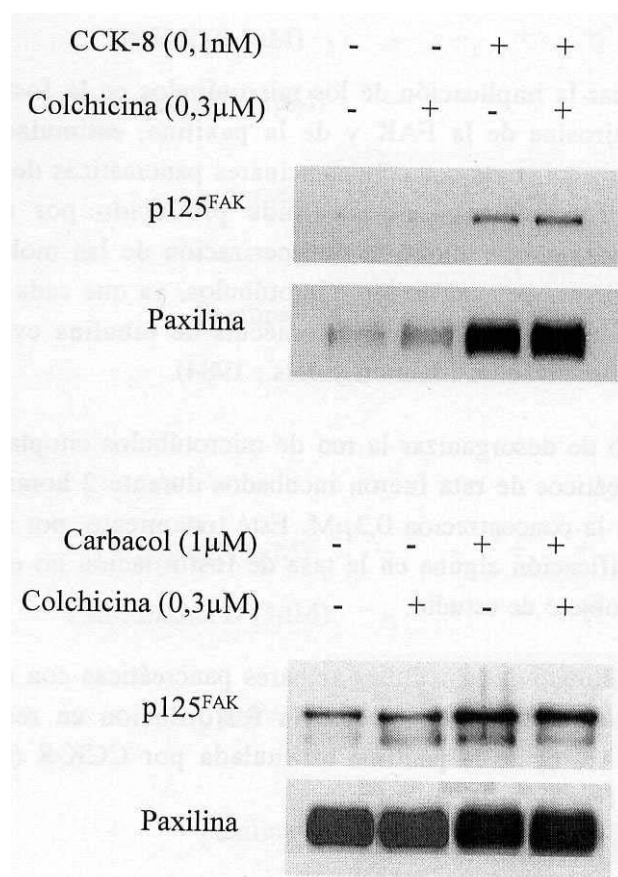


FIGURA 33. Efecto de la incubación durante 2 horas con **colchicina** (0,3 $\mu$ M) en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por **CCK-8** (0,1nM) y **carbacol** (1 $\mu$ M) en acinos pancreáticos de rata. En la figura se muestra un experimento representativo de otros 4.



### **4.3.3. IMPLICACIÓN DE RHO EN LA FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS DE TIROSINA DE LA FAK Y LA PAXILINA.**

Para estudiar el papel de la GTPasa de bajo peso molecular Rho p21 en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol o CCK-8, empleamos la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*. La exoenzima C3 es una ADP-ribosiltransferasa que inhibe la acción de Rho por ADP-ribosilación del residuo de asparragina (Asn<sup>41</sup>), lo que inhibe la unión de Rho con sus sustratos (Sekine y cols., 1989).

El tratamiento de células acinares pancreáticas de rata con exoenzima C3 a la concentración 25µg/ml durante 2 horas, a 37°C, no modificó por sí mismo la tasa de fosforilación en residuos de tirosina ni de la FAK ni de la paxilina. Sin embargo, este tratamiento provocó una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol (1µM) (figura 34). El tratamiento con la exoenzima C3 inhibió en un  $53,4 \pm 8,1\%$  y un  $58,5 \pm 7,6\%$  la fosforilación de la FAK y la paxilina, respectivamente.

El tratamiento de acinos pancreáticos de rata con exoenzima C3 a las condiciones descritas con anterioridad provocó una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por CCK-8 (0,1nM) (figura 35). El tratamiento con la exoenzima C3 inhibió en un  $50,0 \pm 8,7\%$  y un  $37,0 \pm 6,4\%$  la fosforilación de la FAK y la paxilina, respectivamente.

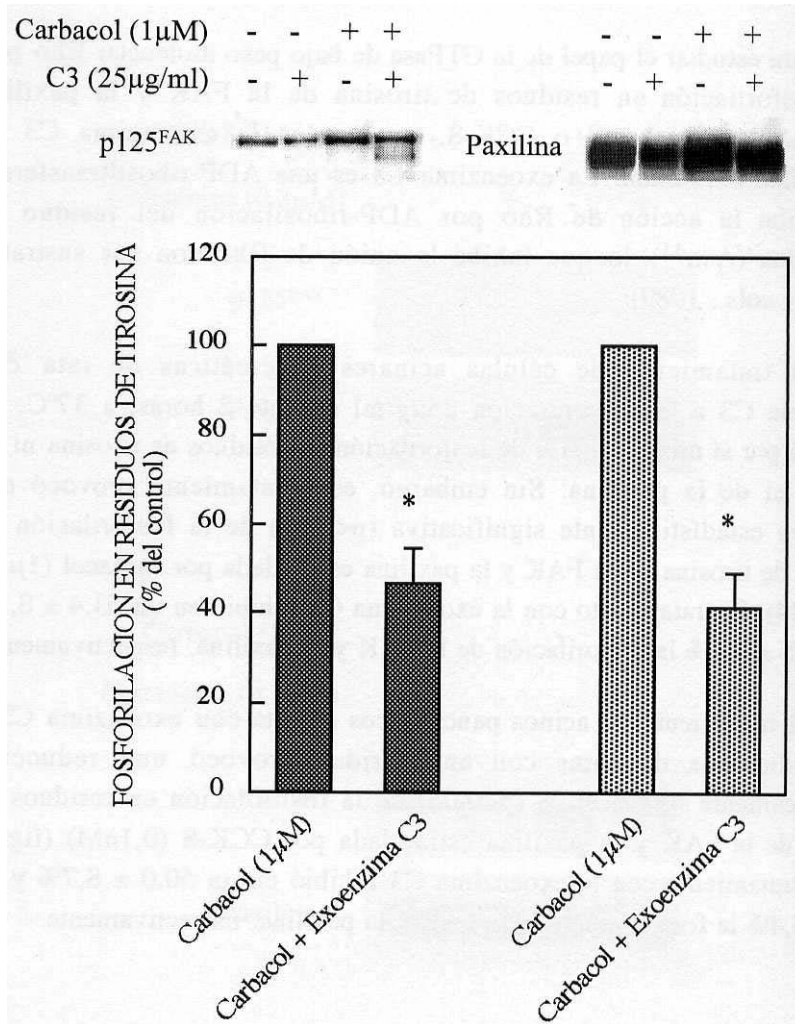


FIGURA 34. Efecto del **carbacol** (1 $\mu$ M) en la fosforilación en residuos de tirosina de la **FAK** (izquierda) y la **paxilina** (derecha) en células acinares pancreáticas de rata pretratadas o no con la exoenzima C3. Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media  $\pm$  EEM del porcentaje del incremento en fosforilación causado por carbacol (1 $\mu$ M) (n=6). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida con carbacol (1 $\mu$ M) en acinos no tratados con la exoenzima C3 (p<0,05). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 5.

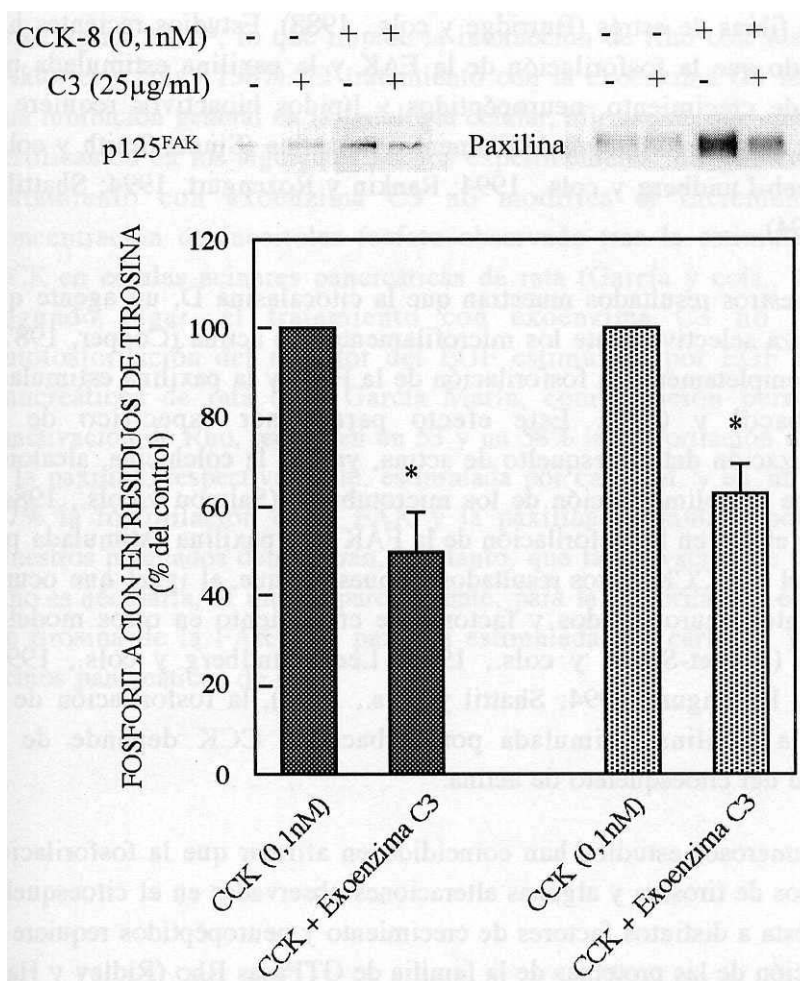


FIGURA 35. Efecto de la **CCK-8** (0,1nM) en la fosforilación en residuos de tirosina de la **FAK** (izquierda) y la **paxilina** (derecha) en células acinares pancreáticas de rata pretratadas o no con la exoenzima C3. Los resultados representados en la parte inferior de la figura son la media  $\pm$  EEM del porcentaje del incremento en fosforilación causado por CCK (0,1nM) (n=5). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida con CCK (0,1nM) en acinos no pretratados con exoenzima C3 ( $p < 0,05$ ). En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de otros 4.

#### 4.4. DISCUSIÓN

Las placas de adhesión focal constituyen un nexo de unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, y en ellas se insertan las fibras de tensión o fibras de estrés (Burrige y cols., 1988). Estudios recientes han demostrado que la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por factores de crecimiento, neuropéptidos y lípidos bioactivos requiere la presencia de una red íntegra de filamentos de actina (Sinnott-Smith y cols., 1993; Leeb-Lundberg y cols., 1994; Rankin y Rozengurt, 1994; Shattil y cols., 1994).

Nuestros resultados muestran que la citocalasina D, un agente que desorganiza selectivamente los microfilamentos de actina (Cooper, 1987), inhibió completamente la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol y CCK. Este efecto parece ser específico de la desorganización del citoesqueleto de actina, ya que la colchicina, alcaloide que inhibe la polimerización de los microtubulos (Salmon y cols., 1984), carece de efecto en la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por el carbacol o la CCK. Estos resultados demuestran que, al igual que ocurre con distintos neuropéptidos y factores de crecimiento en otros modelos celulares (Sinnott-Smith y cols., 1993; Leeb-Lundberg y cols., 1994; Rankin y Rozengurt, 1994; Shattil y cols., 1994), la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol o CCK depende de la integridad del citoesqueleto de actina.

Numerosos estudios han coincidido en afirmar que la fosforilación en residuos de tirosina y algunas alteraciones observadas en el citoesqueleto en respuesta a distintos factores de crecimiento y neuropéptidos requiere la participación de las proteínas de la familia de GTPasas Rho (Ridley y Hall, 1992; Rankin y cols., 1994; Ridley, 1994). Esta conclusión se apoya en los resultados obtenidos mediante microinyección de Rho en fibroblastos, células donde este tratamiento induce la fosforilación de la FAK y la paxilina (Flinn y Ridley, 1996), la formación de fibras de tensión y de placas de adhesión focal (Ridley, 1995). Por otro lado, la inhibición de la actividad de Rho con la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, o el estudio con fragmentos inactivos de Rho, redujo la fosforilación de la FAK y la paxilina en diferentes modelos celulares (Rankin y cols., 1994; Renshaw y cols., 1996; Sah y cols., 1996). Estos hechos nos hicieron plantearnos si las proteínas de la familia Rho participan en la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol o CCK. Para inactivar Rho incubamos acinos pancreáticos de rata con la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, transferasa que ADP ribosila Rho en el residuo de asparragina Asn<sup>41</sup>, lo que impide la interacción de Rho con sus sustratos (Aktories y cols., 1987). El tratamiento con la exoenzima C3 no produce una inhibición general en la fisiología celular, afirmación que encuentra su justificación en los siguientes hechos experimentales: en primer lugar, el tratamiento con exoenzima C3 no modifica el incremento de

la concentración de inositoles fosfato observado tras la estimulación con CCK en células acinares pancreáticas de rata (García y cols., 1997). En segundo lugar, el tratamiento con exoenzima C3 no inhibe la autofosforilación del receptor del EGF estimulada por EGF en acinos pancreáticos de rata (L.J. García Marín, comunicación personal). La inactivación de Rho, redujo en un 53 y un 58% la fosforilación de la FAK y la paxilina, respectivamente, estimulada por carbacol, y en un 50 y un 37% la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por CCK-8. Nuestros resultados demuestran, por tanto, que la activación de la GTPasa Rho es necesaria, al menos parcialmente, para la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol y CCK en acinos pancreáticos de rata.

CAPÍTULO 5

IMPLICACIONES DE LA TIROSINA CINASA FAK EN LOS  
PROCESOS DE SECRECIÓN PANCREÁTICA.  
DISCUSIÓN GENERAL

### 5.1. INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han demostrado que la activación de receptores acoplados a proteínas G de membrana, los cuales carecen de actividad tirosina cinasa intrínseca, da lugar a un incremento en la fosforilación de residuos de tirosina de un gran número de proteínas intracelulares (Lutz y cols., 1993; Sinnet-Smith y cols., 1993; Zachary y cols., 1993; Duan y cols., 1994; Rozengurt, 1995). La cascada de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina posiblemente es una ruta intracelular de transducción de señales que juega un papel muy importante en diferentes procesos celulares, entre los que se incluyen el crecimiento, la motilidad y la morfología celular (Burrige y cols., 1988; Sinnet-Smith y cols., 1993; Shattil y col., 1994; Rozengurt, 1995).

Burrige y cols. (1988) y Rozengurt (1995) han coincidido en sugerir que la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y de la paxilina podría ser particularmente importante en la mediación de un gran número de mecanismos celulares. En capítulos anteriores se demostró que tanto el carbacol, al ocupar los receptores muscarínicos, como la CCK-8, al ocupar los estados de alta y baja afinidad del receptor CCK<sub>A</sub>, producen una rápida fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina en células acinares pancreáticas.

Como se indicó en el capítulo I, numerosos estudios (Robberecht y cols., 1978; Peralta y cols., 1988; Jensen, 1994) han demostrado que el carbacol y la CCK-8 producen activación de la PLC, dando lugar a la hidrólisis de los inositoles fosfato con la generación de diacilglicerol e inositol 1,4,5-trisfosfato. Estos metabolitos producen, respectivamente, la activación de la PKC y la liberación de ion calcio desde los depósitos intracelulares. Estas rutas son muy importantes en la mediación de múltiples efectos celulares producidos por el carbacol o la CCK. En capítulos anteriores se comprobó que al igual que ocurre para la secreción enzimática estimulada por carbacol y CCK (Jensen, 1994; Yule y Williams, 1994) la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol o CCK se lleva a cabo a través de rutas tanto dependientes como independientes de la PLC.

Diversos autores han estudiado en células acinares pancreáticas el papel de las proteínas tirosinas cinasas en la secreción enzimática con resultados muy diferentes. Piiper y cols. (1994) han descrito que la genisteína, un inhibidor de las proteínas tirosinas cinasas, inhibe parcialmente la secreción enzimática estimulada por bombesina o carbacol. Lutz y cols. (1993) han demostrado que la genisteína inhibe la secreción enzimática dependiente de los incrementos en  $[Ca^{2+}]_i$  y la secreción de amilasas estimulada por CCK-8. Por otro lado, se ha comprobado que la genisteína carece de efecto en la secreción enzimática estimulada por VIP o secretina

(Duan y cols., 1994). Piiper y cols. (1994) comprobaron que el efecto de la inhibición de las tirosinas cinasas en la secreción enzimática estimulada por CCK-8 o carbacol se produce únicamente a bajas concentraciones de estos secretagogos, sugiriendo que la secreción enzimática estimulada por dosis supramáximas de carbacol o CCK podría ser regulada por las tirosinas cinasas de un modo distinto. Las tirosinas cinasas también participan en la producción de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> estimulada por carbacol, CCK-8 o bombesina, como lo demuestra la inhibición que la genisteína ocasiona en la capacidad de estos agonistas para incrementar la concentración de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Piiper y cols., 1994). Por el contrario, Jena y cols. (1991) han observado que la adición de tirosina fosfatasa a células acinares pancreáticas permeabilizadas incrementa la secreción de amilasas dependiente de calcio.

Se han llevado a cabo diferentes estudios en otros modelos celulares estudiando la relación entre las tirosinas cinasas y la secreción. Así, se ha comprobado que las tirosinas cinasas son necesarias para la secreción de catecolaminas en células cromafines de glándula adrenal en bóvidos (Cox y cols., 1996), así como para la regulación de la liberación de prostaciclina por las células endoteliales humanas (Wheeler-Jones y cols., 1996). Ambos estudios sugieren que el papel de las tirosinas cinasas en la secreción está mediado por el calcio intracelular (Cox y cols., 1996; Wheeler-Jones y cols., 1996). Estudios realizados en células  $\beta$  por Konrad y cols. (1996) han puesto de manifiesto que el inhibidor de las tirosinas cinasas AG879 produce una inhibición dependiente de la concentración tanto de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina como de la secreción de insulina, además han sugerido que la fosforilación de una proteína, aún no bien identificada y denominada p125 de células  $\beta$ , podría ser necesaria para la secreción de insulina. Por el contrario, estudios realizados en células acinares de glándula parótida han demostrado que existe una relación entre las tirosinas fosfatasa y la secreción de amilasa, indicando que la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina inhibe la secreción de amilasas estimulada por secretagogos (Purushotham y Humphreys-Beher, 1995; Kinoshita y cols., 1996). Asimismo, el pretratamiento de plaquetas con genisteína, que redujo la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, provocó un incremento en la secreción de serotonina estimulada por ionomicina (Dallas y cols., 1996).

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



endoplásmico, este hecho sugiere que las alteraciones producidas por los inhibidores de las tirosinas cinasas en la entrada de calcio en la célula podrían ser las responsables de la inhibición de la secreción de amilasas estimulada por los secretagogos ensayados (Yule y cols., 1994).

Numerosos estudios han sugerido que las GTPasas de bajo peso molecular podrían participar en la transducción de señales originadas tras la estimulación hormonal en células acinares pancreáticas. Esta actividad podría estar relacionada, entre otros fenómenos, con la regulación del transporte de vesículas en la secreción y con la regulación de la exocitosis en estas células. (Profrock y cols., 1992; Zimmermann P y cols., 1992; Zeuzem y cols., 1994; Ohnishi y cols., 1996). Diferentes estudios, llevados a cabo en otros modelos celulares, han indicado que las proteínas de la superfamilia Ras juegan un papel muy importante en el transporte de membrana y en la exocitosis (Price y cols., 1995; Norman y cols., 1996). Recientemente se ha comprobado que las GTPasas de la familia Rho son necesarias para el proceso secretor de la  $\beta$ -hexosaminidasa en mastocitos (Price y cols., 1995; Mariot y cols., 1996) y en células RBL-2H3 (Yonei y cols., 1995). En células RBL-2H3 permeabilizadas el pretratamiento con la exoenzima C3 reduce la secreción de  $\beta$ -hexosaminidasa inducida por calcio o GTP $\gamma$ S más calcio (Yonei y cols., 1995). El tratamiento de mastocitos permeabilizados con exoenzima C3 o la introducción del inhibidor de la disociación de RhoGDP (RhoGDI) redujo la secreción de  $\beta$ -hexosaminidasa estimulada por GTP $\gamma$ S o calcio (Price y cols., 1995; Mariot y cols., 1996). Además, la adición de una isoforma mutante activa de Rho en estas células incrementó la secreción inducida por calcio (Norman y cols., 1996). En los mastocitos, la función de Rho en la secreción podría ser independiente de su bien conocida participación mediando señales entre los receptores de membrana y el citoesqueleto (Norman y cols., 1996).

Estudios realizados en distintos sistemas celulares (células Swiss 3T3 y plaquetas) han puesto de manifiesto que la estimulación de la FAK y de la paxilina por diferentes neuropéptidos requiere la integridad de los microfilamentos de actina (Sinnott-Smith y cols., 1993; Leeb-Lundberg y cols., 1994; Shattil y cols., 1994). En capítulos anteriores se demostró que el tratamiento de acinos pancreáticos con citocalasina D, agente que despolimeriza los microfilamentos de actina (Rozengurt, 1995), inhibe la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol o CCK-8. Estudios previos realizados en células acinares pancreáticas han demostrado que la activación del receptor de la CCK<sub>A</sub> con concentraciones supramáximas de ceruleína, un análogo de la CCK-8, provocan una desorganización progresiva de los microtúbulos y microfilamentos de actina, fenómeno que podría explicar la inhibición de la secreción de amilasas producida por CCK-8 a concentraciones supramáximas (O'Konski y Pandol, 1993; Jungermann y cols., 1995).

Uno de los primeros fenómenos que ocurren durante la exocitosis, la translocación de los gránulos de secreción hacia el polo apical de la célula, requiere una serie de fuerzas propulsivas. Muchos estudios han apoyado la hipótesis de que estas fuerzas estaban generadas bien por los microtúbulos o bien por estructuras contractiles constituidas por la asociación actina-miosina (Chang y Jamieson, 1989). Hoy en día no está claro si los microtúbulos participan o no activamente en la exocitosis. En acinos pancreáticos de ratón, la colchicina, que desorganiza los microtúbulos, no tuvo efecto en la secreción de amilasas, sin embargo, si afectó al transporte intracelular o la neosíntesis de proteínas (Williams, 1981).

Muchos de los estudios relacionados con el citoesqueleto se han llevado a cabo usando agentes farmacológicos que desorganizan los elementos del citoesqueleto. Sin embargo, los resultados obtenidos han sido difícilmente interpretables debido a que las sustancias empleadas tenían multitud de efectos secundarios (Chang y Jamieson, 1989).

Recientemente se ha demostrado que existe una estrecha relación entre las alteraciones morfológicas del citoesqueleto de la región apical de la célula y el efecto inhibitorio que en la secreción tienen concentraciones supramáximas (mayores de 0,1nM) de determinados secretagogos, como la CCK y su análogo, la ceruleína (O'Konski y Pandol, 1990; O'Konski y Pandol, 1993). Burnham y cols. en 1982, estudiando el efecto de la citocalasina B en la inhibición producida por la CCK-8 a concentraciones supramáximas, sugirieron que la inhibición de la secreción que se produce a concentraciones supramáximas de CCK-8 se debía a una alteración de la homeostasis del calcio y a una alteración en la contracción de los microfilamentos de actina (Burnham y Williams, 1982). Los resultados obtenidos por O'Konski y Pandol (1990; 1993) han demostrado que las concentraciones supramáximas de ceruleína, que provocan la inhibición de la secreción, causan una destrucción rápida de los microvilli de la región apical de la membrana celular, así como de los microfilamentos de actina, de los microtúbulos y de los filamentos intermedios localizados en la porción apical de la célula. La relación entre estos dos sucesos, inhibición del proceso secretor y desorganización o despolimerización del citoesqueleto de la región apical de la célula, sugiere que el citoesqueleto juega un papel importante en el proceso secretor (O'Konski y Pandol, 1993). Por otro lado, algunos autores (Sato y cols., 1989; Stark y cols., 1989) han comprobado que el análogo de la CCK, JMV-180, no causa inhibición de la liberación de amilasas a concentraciones altas. Cuando se incuban acinos pancreáticos con JMV-180 a concentraciones de 1 a 3  $\mu\text{M}$  (concentraciones a las que ocupa el 100% de los receptores de la CCK) se observó que el citoesqueleto de la región apical y los microfilamentos de actina no sufrieron ninguna modificación (O'Konski y Pandol, 1993). El JMV-180 protege el citoesqueleto de la región apical de las alteraciones producidas por concentraciones supramáximas de ceruleína y

paralelamente, evita la inhibición de la secreción de amilasas causada por dosis supramáximas de CCK o ceruleína (O'Konski y Pandol, 1993).

Estudios recientes (Ueda y cols., 1992) han demostrado que el taxol, un estabilizador microtubular, previene la inhibición de la secreción en acinos pancreáticos causada por concentraciones supramáximas de ceruleína. Estos resultados indican que la ceruleína produce una disrupción de los microtúbulos, lo que da lugar a una inhibición de la secreción.

En las células acinares pancreáticas estimuladas, la estructura formada por microfilamentos de actina del polo apical se reduce cuando la membrana de un gránulo de zimógeno se aproxima a la membrana plasmática. Sin embargo, en la célula acinar hiperestimulada con CCK o ceruleína los microvilli, los microfilamentos de actina y los microtúbulos desaparecen, produciéndose una inhibición de la secreción. Bajo estas condiciones, algunas estructuras que normalmente no se encuentran en el polo apical, como ribosomas o el retículo endoplásmico rugoso, aparecen en esta región (O'Konski y Pandol, 1990).

Así pues, se extraen dos conclusiones de estos hallazgos; en primer lugar es necesario un citoesqueleto intacto para mantener la polaridad celular y permitir el proceso de exocitosis y en segundo lugar los cambios en el citoesqueleto de la región apical, indicados previamente, pueden estar relacionados con la inhibición de la secreción pancreática observada tras la estimulación con concentraciones supramáximas de CCK y carbacol (Golelick y Jamieson, 1994).

Estudios diferentes, llevados a cabo en acinos pancreáticos de rata, han puesto de manifiesto que la inhibición de la despolimerización de los filamentos de actina tiene un efecto negativo en la secreción enzimática, indicando que el cortex celular actúa como un bloqueante de la secreción. No obstante, los filamentos de actina intervienen activamente en la secreción, ya que su desorganización también la reduce (Muallen y cols., 1995).

No está muy claro si la participación del citoesqueleto en los procesos de exocitosis y de almacenamiento de los gránulos de secreción es un proceso activo, en el que intervengan interacciones actina-miosina para generar la fuerza que conduzca estos gránulos hacia la membrana plasmática. Alternativamente, las proteínas del citoesqueleto podrían participar de una forma pasiva, actuando como simples guías que permitan la aproximación de los gránulos al polo apical de la célula durante la secreción (Chang y Jamieson, 1989).

El citoesqueleto de actina participa, por lo tanto, en dos procesos celulares cuya posible relación se desconoce, la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina y la secreción enzimática. La regulación de la secreción es un proceso muy complejo en el participan

un gran número de proteínas y componentes celulares entre los que se encuentran la PLC, las tirosinas cinasas, las GTPasas de bajo peso molecular y el citoesqueleto, entre otros; sin embargo, no se conoce con exactitud cuales son los mecanismos que provocan el movimiento de los gránulos de zimógeno hacia el polo apical de la célula y los procesos de exocitosis. Como hemos demostrado en capítulos anteriores, similares componentes celulares participan también en la regulación de la fosforilación de la FAK y de la paxilina. A la vista de estos resultados nos propusimos el siguiente OBJETIVO:

- Comprobar si la fosforilación de la tirosina cinasa FAK y su sustrato paxilina es necesaria para que tenga lugar el proceso secretor enzimático que normalmente ocurre en las células acinares pancreáticas como consecuencia de la unión del carbacol y de la CCK a sus respectivos receptores de membrana.

## **5.2. METODOLOGÍA**

### **5.2.1 ANIMALES Y PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS**

Los animales, su calidad biológica, su preparación y manejo previo a la realización de los experimentos, y la técnica empleada para obtener la suspensión acinar se describen en el capítulo II, "Metodología general", apartados 2 y 3 respectivamente.

### **5.2.2 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE AMILASAS**

La técnica empleada para determinar la secreción de amilasas en acinos pancreáticos se describe en el capítulo II, "Metodología general", apartado 4 .

Como se menciona en este apartado, en este protocolo experimental fue necesaria la preincubación de los acinos con diferentes inhibidores: U73122 o genisteína durante 30 minutos y exoenzima C3 o citocalasina D durante 2 horas . Tras la preincubación la suspensión de acinos se centrifugó a 50g, durante 2 minutos a 4°C, y se resuspendió en el volumen indicado en el primer párrafo del apartado citado anteriormente (100 ml en solución de incubación). Los valores de los ceros, controles y totales (ver capítulo II) se obtuvieron de la misma solución de acinos que los valores experimentales, realizando los calculos según se indica en el apartado 4 del citado capítulo II.

### **5.2.3 METODOLOGÍA PARA DETERMINAR LA FOSFORILACIÓN DE LA FAK, Y LA PAXILINA EN RESIDUOS DE TIROSINA**

El método empleado para determinar la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es el Western Blotting, descrito con mayor profundidad en capítulo II.

El protocolo seguido para la realización de la inmunoprecipitación y el inmunoblotting en este capítulo es el descrito previamente en el capítulo III.

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.1. ESTIMULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE AMILASAS EN ACINOS PANCREÁTICOS

##### 5.3.1.1. EFECTO DE LA OCUPACIÓN DE LOS RECEPTORES COLINÉRGICOS

La estimulación de acinos pancreáticos con el agonista colinérgico carbacol durante 30 minutos a concentraciones comprendidas entre 30nM y 100µM produce un incremento dependiente de la concentración en la secreción de amilasas, (figura 36). El perfil de la curva mostró un efecto bifásico: hasta la dosis máxima (10µM con un efecto de  $18 \pm 0,7$  % de la liberación de amilasas respecto al total) el carbacol produjo respuestas progresivamente mayores, mientras que a dosis superiores a la máxima los efectos fueron disminuyendo (a 100µM se obtuvo un valor de  $12,8 \pm 1,5$  % de la liberación de amilasas respecto al total). La menor concentración de carbacol (30nM) produjo una respuesta similar al basal,  $2,2 \pm 1,7$  % de la liberación de amilasas respecto al total.

El cálculo de la EC50 y del EM mediante regresión no lineal indicó unos valores respectivos de  $0,4 \pm 0,2$  µM y  $17,3 \pm 1,5$  % de la liberación de amilasas respecto al total (ver tabla 2).

Con objeto de estudiar el papel de la cascada de mecanismos iniciada tras la activación de la PLC, empleamos el U-73122 (1-[6-((17β-3-metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-il)-amino)-hexil]-1H-pirrole-2,5-diona), sustancia que inhibe la activación de la PLC inducida por agonistas (Yule y Williams, 1992).

Previamente a la realización del estudio se establecieron las condiciones experimentales óptimas de utilización del inhibidor de la PLC. Los resultados obtenidos indicaron que las condiciones óptimas de inhibición consisten en incubar la solución de acinos pancreáticos durante 30 minutos previos al inicio del ensayo, con la concentración 30µM.

La concentración de U-73122 empleada en la realización del siguiente bloque experimental (30µM) no modificó la secreción de amilasas no estimulada (secreción basal).

La figura 36 representa el efecto que la inhibición de la PLC tiene en la secreción de amilasas estimulada por carbacol. El U-73122 a la concentración 30µM produjo un 43% de inhibición de la secreción máxima estimulada por el carbacol (10µM), alcanzando un valor máximo en la secreción basal a la concentración 10µM de  $10,4 \pm 2,5$ % de la liberación de amilasas respecto al total.

La tabla 2 contiene los parámetros de la curva dosis-respuesta del carbacol en presencia de U-73122 (30 $\mu$ M). Los valores calculados para la nueva curva de secreción del carbacol indicaron una inhibición estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en el efecto máximo, en tanto que la EC50 permaneció inalterada (ver tabla 2).

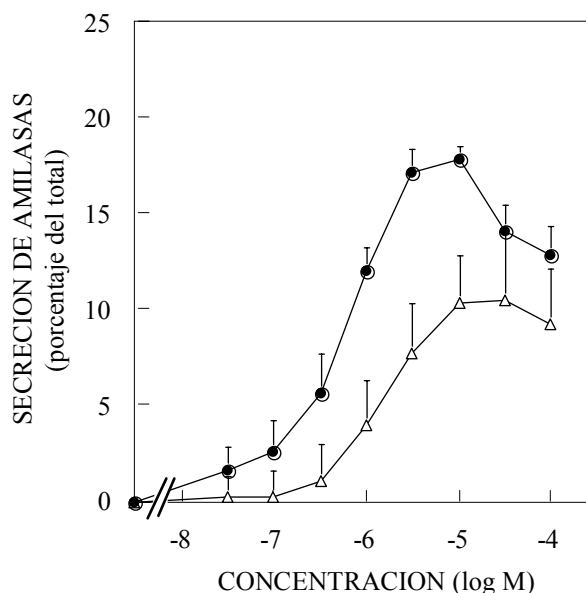


FIGURA 36. Curva concentración-efecto del **carbacol** (círculos cerrados) y **carbacol + U-73122** (30 $\mu$ M) (triángulos abiertos) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal ( $n=5$ ). El valor de la secreción basal fue de  $4,6 \pm 0,5$  y de  $4,5 \pm 0,7\%$  de la liberación de amilasas respecto al total para las curvas de carbacol y de carbacol + U73122, respectivamente.

### 5.3.1.2. EFECTO DE LA OCUPACIÓN DEL RECEPTOR DE LA CCK

Cuando estimulamos acinos pancreáticos de rata con CCK-8 durante 30 minutos a concentraciones comprendidas entre 1pM y 10nM las respuestas fueron dependientes de la concentración, como puede observarse en la figura 37. El perfil de la curva mostró un efecto bifásico: hasta la concentración máxima (300pM con un efecto de  $20,1 \pm 2,5$  % de la liberación de amilasas respecto al total) la CCK-8 produjo respuestas progresivamente mayores, mientras que a concentraciones superiores a la máxima los efectos fueron menores (inhibición supramáxima) (a 10nM se obtuvo un valor de  $8,2 \pm 2,1$  % de la liberación de amilasas respecto al total). La menor concentración de CCK-8 ensayada (1pM) produjo una respuesta muy similar al basal,  $1 \pm 0,5$  % de la liberación de amilasas respecto al total. Recordemos que todos los datos se representan como valores sobre el basal.

El cálculo de la EC50 y del EM mediante regresión no lineal indicó unos valores respectivos de  $23,6 \pm 1,6$  pM y  $19,1 \pm 1,5$  % de la liberación de amilasas respecto al total (ver tabla 2).

La respuesta obtenida por la CCK-8 en presencia del inhibidor de la PLC, U-73122, se presenta en la figura 37. El U-73122 (30 $\mu$ M) redujo en un 59% la secreción de amilasas estimulada por CCK-8 (300pM). La tabla 2 muestra los parámetros de la curva concentración-respuesta de la CCK-8 en presencia de U-73122 (30 $\mu$ M).

La curva concentración-respuesta a la CCK-8 en presencia de U-73122 muestra un efecto máximo sobre el basal a la concentración de 100pM de  $6,5 \pm 1,7$  % de la liberación de amilasas respecto al total, muy inferior a la respuesta obtenida con la CCK-8 en condiciones normales.

El estudio de los valores calculados para el EM y la EC50 indicaron que el U-73122 produjo una disminución estadísticamente significativa en el EM ( $p < 0,05$ ), en tanto que no modificó la EC50, ni el perfil bifásico de la curva dosis-respuesta para la CCK-8.

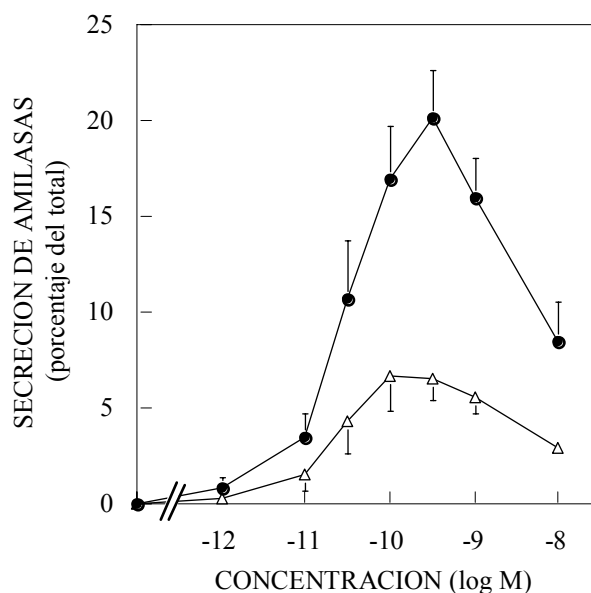


FIGURA 37. Curva concentración-efecto de la CCK-8 (círculos cerrados) y CCK-8 + U-73122 (30 $\mu$ M) (triángulos abiertos) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal ( $n=6$ ). El valor de la secreción basal fue de  $4,8 \pm 0,3$  y de  $3,8 \pm 0,9$  % de la liberación de amilasas respecto al total para las curvas de CCK-8 y de CCK-8 + U73122, respectivamente.

Al estimular la suspensión de acinos pancreáticos con el agonista parcial de la CCK, JMV-180 (30pM-0,1 $\mu$ M) la respuesta obtenida fue de la misma magnitud que la observada para la CCK-8 (figura 38); sin embargo, el perfil de la curva no mostró un efecto bifásico, no hubo inhibición supramáxima, siendo el perfil de la curva concentración-efecto sencillo.



La curva presenta un efecto máximo a la concentración  $0,1\mu\text{M}$  de  $19,5 \pm 2,2$  % de la liberación de amilasas respecto al total, similar a la respuesta máxima obtenida con la CCK-8.

El cálculo de la  $EC_{50}$  y del EM dió como resultado  $7,5 \pm 1,3$  nM y  $20,9 \pm 1,4$  % de la liberación de amilasas respecto al total, respectivamente (ver tabla 2).

La incubación de los acinos pancreáticos con el inhibidor de la PLC, U-73122 ( $30\mu\text{M}$ ), no ocasionó ningún cambio en la curva concentración-respuesta para el JMV-180, (figura 38; tabla 2). Estos datos están de acuerdo con lo descrito en la bibliografía, donde se cita que el JMV-180 no activa la PLC (ver Jensen, 1994 para revisión).

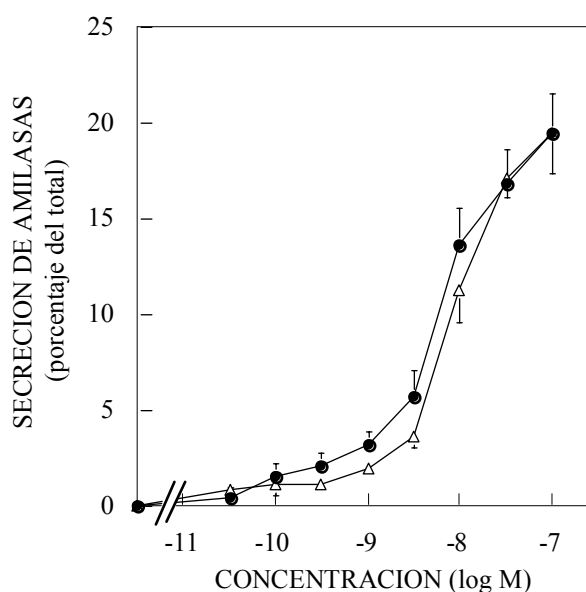


FIGURA 38. Curva concentración-efecto del **JMV-180** (círculos cerrados) y **JMV-180 + U-73122** ( $30\mu\text{M}$ ) (triángulos abiertos) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal ( $n=6$ ). El valor de la secreción basal fue del  $4,6 \pm 0,5$  y de  $5,1 \pm 0,6$  % de la liberación de amilasas respecto al total para las curvas de JMV-180 y de JMV-180 + U73122, respectivamente.

	EC50	EFEECTO MAXIMO (%de la liberación de amilasas respecto al total)
CARBACOL	0,4 ± 0,2 µM	17,3 ± 1,5
CARBACOL+U73122	1,1 ± 1,2 µM	10,5 ± 0,5*
CCK-8	23,6 ± 1,6 pM	19,1 ± 1,5
CCK+U73122	20,9 ± 2,8 pM	4,8 ± 0,7*
JMV-180	7,5 ± 1,3 nM	20,9 ± 1,4
JMV-180+U73122	11,3 ± 1,2 nM	22.2 ± 1,4

TABLA 2: Parámetros de las curvas dosis-respuesta de los grupos carbacol, CCK-8 y JMV-180 solos y en combinación con U-73122 (30µM). Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (ESM) sobre el basal. \* Refleja la existencia de diferencias estadísticamente significativas respecto al valor en ausencia del inhibidor, (p<0,05).

### **5.3.2 PAPEL DE LAS TIROSINAS CINASAS EN EL PROCESO DE SECRECIÓN DE AMILASAS**

Para estudiar el papel de las proteínas tirosinas cinasas en el proceso secretor se preincubaron células acinares pancreáticas de rata con el inhibidor específico de estas proteínas, la genisteína, a la concentración de 300µM.

La preincubación de los acinos pancreáticos, durante 30 minutos con genisteína 300µM así como su posterior presencia durante la incubación no modificaron la secreción basal de amilasas.

#### **5.3.2.1. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS TIROSINAS CINASAS EN LA SECRECIÓN DE AMILASAS ESTIMULADA POR LA OCUPACIÓN DE LOS RECEPTORES COLINÉRGICOS.**

La incubación de la solución de acinos pancreáticos durante 30 minutos con la concentración de genisteína 300µM, redujo claramente la secreción de amilasas estimulada por el carbacol (30nM-100µM). La genisteína a la concentración 300µM produjo un 56% de inhibición de la secreción máxima estimulada por el carbacol (10µM). La figura 39 muestra la curva concentración-efecto para el carbacol en presencia de genisteína (300µM).

Los valores de la curva concentración-efecto calculados muestran una inhibición estadísticamente significativa (p<0,05) del efecto máximo, con un valor de 7,8 ± 0,7 % de la

liberación de amilasas respecto al total frente al  $17,3 \pm 1,5\%$  obtenido con carbacol.

El valor calculado de la EC50 no sufrió ninguna modificación, así como el perfil bifásico de la curva de secreción de amilasas para el carbacol (ver tabla 3).

Tanto los resultados preliminares donde se inhibió la PLC, como aquellos donde se inhibieron las proteínas tirosinas cinasas, reflejaron que la reducción en la secreción de amilasas estimulada no fue completa. Dado que en la bibliografía se ha descrito que las tirosinas cinasas y la PLC están relacionadas, ya que la genisteína inhibe la secreción de amilasas dependiente de calcio (Lutz y cols., 1993) nos planteamos estudiar el efecto combinado de los inhibidores de ambas rutas intracelulares.

La figura 39 muestra el efecto combinado del inhibidor de la PLC, U-73122 a la concentración  $30\mu\text{M}$ , y el inhibidor de las proteínas tirosinas cinasas, genisteína, a la concentración  $300\mu\text{M}$ , en la secreción de amilasas estimulada por carbacol.

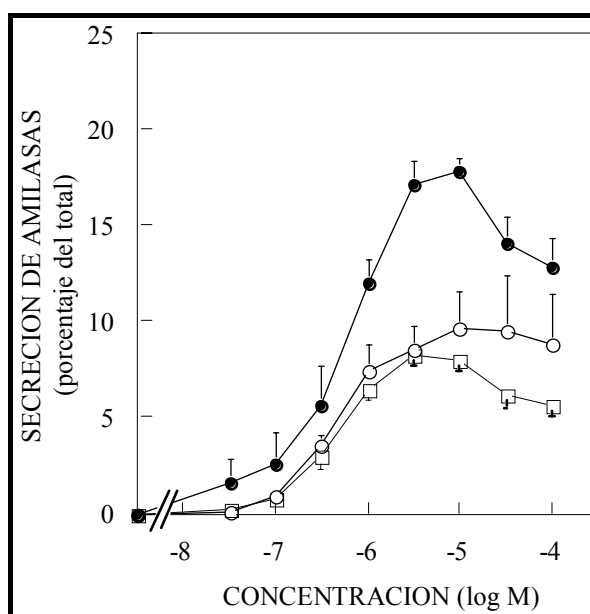


FIGURA 39. Curva concentración-efecto del **carbacol** (círculos cerrados), **carbacol + genisteína** ( $300\mu\text{M}$ ) (cuadrados abiertos) y **carbacol + U-73122** ( $30\mu\text{M}$ ) + **genisteína** ( $300\mu\text{M}$ ) (círculos abiertos) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal ( $n=5$ ). El valor de la secreción basal fue del  $4,6 \pm 0,5$ ,  $4,4 \pm 0,3$  y  $3,1 \pm 0,1\%$  de la liberación de amilasas respecto al total para las curvas de carbacol, de carbacol + genisteína y de carbacol + ambos inhibidores, respectivamente.

La combinación de ambos inhibidores provocó una reducción en la secreción de amilasas estimulada por carbacol de la misma magnitud que la observada con genisteína o U-

73122 por separado, El tratamiento de células acinares con ambos inhibidores redujo en un 47% la secreción máxima estimulada por el carbacol ( $10\mu\text{M}$ ), obteniéndose un valor máximo a la concentración  $10\mu\text{M}$  de  $9,6 \pm 1,9$  % de la liberación de amilasas respecto al total (figura 39).

Los valores de la curva concentración-efecto calculados muestran una inhibición estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) del EM; sin embargo, el valor de la EC50 no sufrió modificación alguna (ver tabla 3).

### **5.3.2.2. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS TIROSINAS CINASAS EN LA SECRECIÓN DE AMILASAS ESTIMULADA POR LA OCUPACIÓN DEL RECEPTOR DE LA CCK.**

En la figura 40 se representa el efecto de la inhibición de las proteínas tirosinas cinasas en la curva concentración-efecto de secreción de la CCK-8. Como puede apreciarse en la figura el tratamiento de acinos pancreáticos con genisteína ( $300\mu\text{M}$ ) reduce significativamente la secreción de amilasas estimulada por CCK. La genisteína a la concentración  $300\mu\text{M}$  produjo un 62% de inhibición de la secreción máxima estimulada por la CCK-8 ( $300\text{pM}$ ); no obstante, el perfil bifásico de la curva concentración-efecto permaneció inalterado. La tabla 3 contiene los parámetros de la curva concentración-efecto de la CCK en presencia de genisteína  $300\mu\text{M}$ .

Los valores calculados para la curva de secreción de la CCK en presencia de genisteína ( $300\mu\text{M}$ ) mostraron una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en el efecto máximo obtenido, con un EM de  $6,2 \pm 0,5$  % de la liberación de amilasas respecto al total frente a  $19,1 \pm 1,5$ % obtenido con CCK. Igualmente, el tratamiento con genisteína produce un ligero pero significativo ( $p < 0,05$ )desplazamiento de la curva hacia la izquierda con un valor de EC50 calculado de  $6,5 \pm 2$  pM (ver tabla 3).

La combinación de genisteína con el inhibidor de la PLC (U-73122) provocó una reducción en la secreción de amilasas estimulada por CCK-8 similar a la observada tras la inhibición de la PLC o de las proteínas tirosinas cinasas independientemente. El tratamiento de células acinares con ambos inhibidores redujo en un 56% la secreción máxima estimulada por la CCK-8 ( $300\text{pM}$ )

Los valores de EM y EC50 calculados para la curva concentración-efecto de la CCK-8 en presencia de ambos inhibidores se muestran en la tabla 3. Estos valores muestran que la combinación de ambos inhibidores produjeron una inhibición estadísticamente significativa del EM ( $p < 0,05$ ) así como un desplazamiento de la curva hacia la izquierda ( $p < 0,05$ ). El tratamiento

de acinos pancreáticos de rata con ambos inhibidores no modificó el perfil bifásico de la curva (figura 40).

Los parámetros de la curva concentración-efecto de la CCK-8 en presencia de ambos inhibidores no resultó ser estadísticamente diferente de las observadas para estos inhibidores por separado, ni en cuanto al EM ni a la EC50.

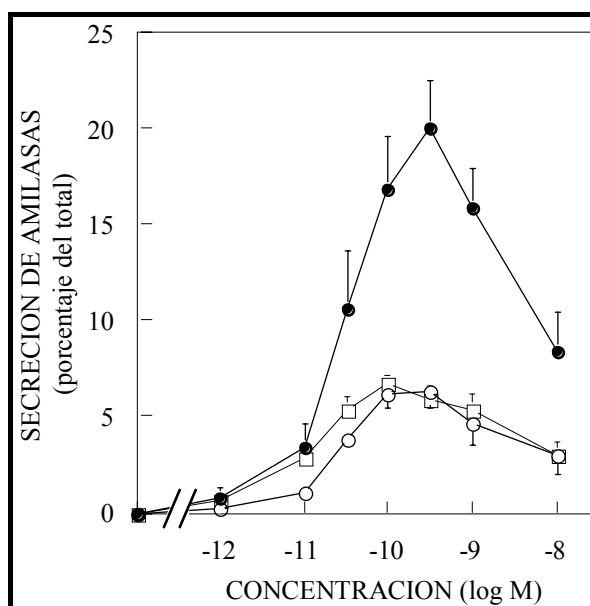


FIGURA 40. Curva concentración-efecto de la **CCK-8** (círculos cerrados), **CCK + genisteína** (300 $\mu$ M) (cuadrados abiertos) y **CCK + U-73122** (30 $\mu$ M) + **genisteína** (300 $\mu$ M) (círculos abiertos) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal (n=6). El valor de la secreción basal fue del  $4,8 \pm 0,3$ ,  $3,9 \pm 0,4$  y  $4,9 \pm 0,1\%$  de la liberación de amilasas respecto al total para las curvas de CCK, de CCK + genisteína y de CCK + ambos inhibidores, respectivamente.

Resultados similares a los observados con CCK se obtuvieron al estudiar el efecto de la genisteína en la secreción estimulada con el agonista de la CCK-8, JMV-180 (figura 41). El tratamiento de acinos pancreáticos de rata con genisteína (300 $\mu$ M) produjo una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en el valor del efecto máximo producido por el JMV-180, mientras que la EC50 y el perfil de la curva no se vieron alterados (figura 40; tabla 3). El tratamiento de células acinares con genisteína redujo en un 57% la secreción máxima estimulada por el JMV-180 (0,1 $\mu$ M).

El efecto de la combinación de genisteína con el inhibidor de la PLC, U-73122, en la respuesta al JMV-180 está representado en la figura 41. En este caso, dado que el U-73122 no tiene ningún efecto en el proceso secretor estimulado por el JMV-180 el perfil de la nueva curva se asemeja al perfil de aquella donde el inhibidor empleado fue la genisteína. El tratamiento de células acinares con genisteína y U-73122 redujo en un 64% la secreción máxima estimulada por el JMV-180 ( $0,1\mu\text{M}$ )

Los valores de EM y EC50 calculados para la curva concentración-efecto del JMV-180 en presencia de genisteína y U-73122 se presentan en la tabla 3. Los datos indican una inhibición estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) del efecto máximo producido por el JMV-180; y un ligero, pero significativo, desplazamiento de la curva hacia la derecha. Lógicamente, el EM de la curva concentración-efecto para el JMV-180 en presencia de ambos inhibidores resultó ser estadísticamente diferente del producido por JMV-180 en presencia de U-73122, ya que este inhibidor no ocasionó ninguna modificación en la respuesta secretora de este secretagogo.

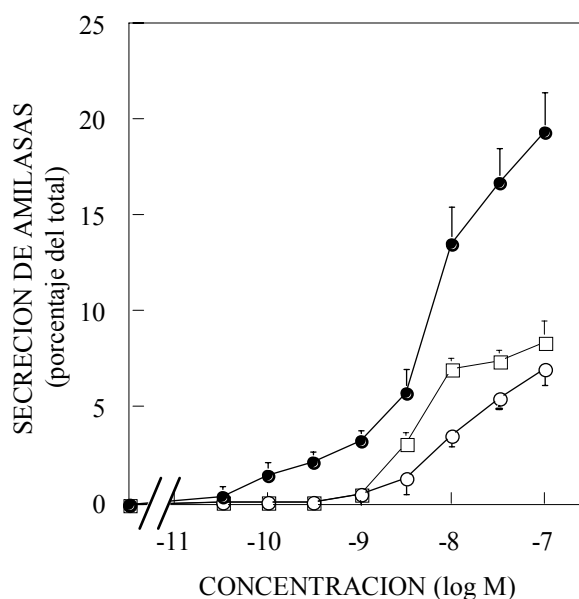


FIGURA 41. Curva concentración-efecto del **JMV-180** (círculos cerrados), **JMV-180 + genisteína** ( $300\mu\text{M}$ ) (cuadrados abiertos) y **JMV-180 + U-73122** ( $30\mu\text{M}$ ) + **genisteína** (círculos abiertos) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal ( $n=6$ ). El valor de la secreción basal fue del  $4,6 \pm 0,5$ ,  $4,3 \pm 0,5$  y  $4 \pm 0,3$  % de la liberación de amilasas respecto al total para las curvas de JMV-180, de JMV-180 + genisteína y de JMV-180 + ambos inhibidores, respectivamente.

Con ninguno de los secretagogos ensayados se produjo una inhibición superior con la combinación de ambos inhibidores, y los parámetros de la curva concentración-respuesta obtenida no resultaron ser diferentes de los observados para ambos inhibidores independientemente (tabla 3).

	EC50	EFEECTO MAXIMO (%de la liberación de amilasas respecto al total)
CCh	0,4 ± 0,2 μM	17,3 ± 1,5
CCh+GEN	0,3 ± 1,9 μM	7,8 ± 0,7*
CCh+GEN+U-73122	0,3 ± 1,2 μM	9,5 ± 0,3*
CCK-8	23,6 ± 1,6 pM	19,1 ± 1,5
CCK-8+GEN	6,5 ± 2,0 pM*	6,2 ± 0,5*
CCK-8+GEN+U-73122	11,5 ± 2,6 pM*	5,0 ± 0,6*
JMV-180	7,5 ± 1,3 nM	20,9 ± 1,4
JMV-180+GEN	8,7 ± 1,2 nM	10,5 ± 0,4*
JMV-180+GEN+U-73122	14,1 ± 1,3 nM*	8,0 ± 0,6*€

TABLA 3: Parámetros de las curvas dosis-respuesta de los grupos carbacol, CCK-8 y JMV-180 solos y en combinación con genisteína (300μM) o genisteína (300μM)+U-73122 (30μM). Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (ESM) sobre el basal. \* Refleja la existencia de diferencias estadísticamente significativas respecto al valor en ausencia de inhibidores, (p<0,05). € Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas respecto al valor de las curvas concentración-efecto en presencia de U-73122.

### **5.3.3. PAPEL DE LAS TIROSINAS CINASAS EN LA FOSFORILACION EN RESIDUOS DE TIROSINA DE LA FAK Y LA PAXILINA**

Como se muestra en el capítulo III, el carbacol y la CCK-8 estimulan la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina en acinos pancreáticos de rata. En el apartado anterior, estudiamos el efecto del inhibidor de las tirosinas cinasas, genisteína, a la concentración 300 $\mu$ M, en la secreción de amilasas estimulada por carbacol y CCK-8. Para hacer un paralelismo entre la secreción de amilasas y la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina, estudiamos el efecto de la genisteína (300 $\mu$ M) en la fosforilación de FAK y paxilina en acinos pancreáticos de rata estimulados con carbacol o CCK.

Para estudiar el efecto de la genisteína en la respuesta al carbacol empleamos la concentración 10 $\mu$ M del agonista, a la cual se obtiene el efecto máximo tanto en secreción de amilasas como en fosforilación de FAK y paxilina estimulada por carbacol. El pretratamiento de células acinares pancreáticas de rata durante 30 minutos con genisteína (300 $\mu$ M) redujo la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol (10 $\mu$ M) en un 63,5  $\pm$  6% y un 54,5  $\pm$  2%, respectivamente (figura 42).

Para estudiar el efecto de la genisteína en la fosforilación de FAK y paxilina en respuesta a CCK-8 y posteriormente compararlo con el efecto en la secreción enzimática empleamos la concentración efectiva 50 en fosforilación de FAK y paxilina (0,1nM), dado que la concentración que produce el efecto máximo en fosforilación (10nM) produce inhibición supramáxima en la estimulación de la secreción enzimática. El pretratamiento de células acinares pancreáticas de rata durante 30 minutos con genisteína (300 $\mu$ M) redujo la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por CCK-8 (0,1nM) en un 67  $\pm$  4% y un 58  $\pm$  9%, respectivamente (figura 43).



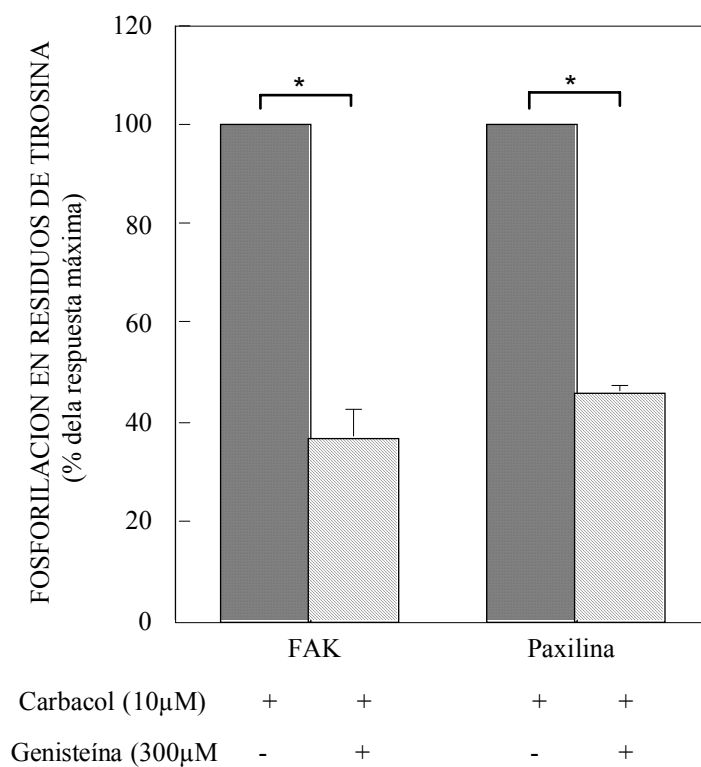


FIGURA 42. Efecto del tratamiento de células acinares pancreáticas con **genisteína** (300 $\mu$ M) en la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por **carbacol** (10 $\mu$ M). Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM y se expresan como porcentaje del incremento en fosforilación causado por carbacol (10 $\mu$ M) (n=4). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida sin genisteína (p<0,05).

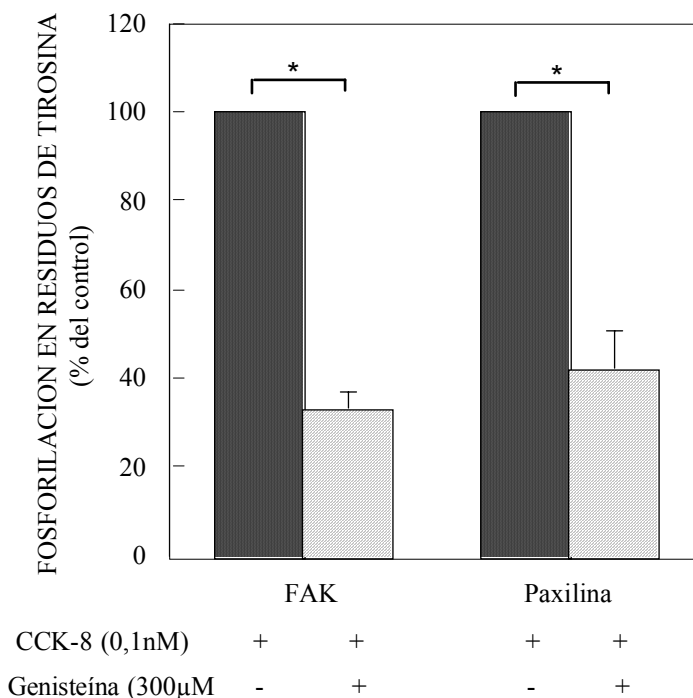


FIGURA 43. Efecto del tratamiento de células acinares pancreáticas con **genisteína** (300µM) en la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por **CCK-8** (0,1nM). Los resultados se representan como la media ± EEM y se expresan como porcentaje del incremento en fosforilación causado por CCK-8 (0,1nM) (n=4). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida sin genisteína (p<0,05).

**5.3.4. IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA RHO EN LA SECRECIÓN DE AMILASAS EN RESPUESTA A DISTINTOS SECRETAGOGOS**

En el capítulo IV se estudió el papel de las GTPasas de la familia Rho en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol o CCK-8, comprobando que este fenómeno depende de la activación de la GTPasa Rho. Para investigar la posible relación entre la fosforilación de la FAK y la paxilina y la secreción de amilasas, comparamos la importancia de la participación de Rho en ambos procesos.

Para estudiar el papel de la GTPasas de bajo peso molecular Rho en la secreción de amilasas, se incubaron acinos pancreáticos de rata con la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* a la concentración 25µg/ml, durante 2 horas a 37°C. El tratamiento con exoenzima C3 no modificó la secreción basal de amilasas.

En la figura 44 se representa el efecto del tratamiento con la exoenzima C3 en la secreción de amilasas en respuesta a la estimulación con la EC50 (0,3µM) y la concentración que produce el efecto máximo (3µM) de carbacol y la EC50 (30pM) y concentración que

produce el efecto máximo (0,1nM) de CCK-8. Las respuestas obtenidas por las diferentes concentraciones de carbacol previo tratamiento con la exoenzima C3 no resultaron ser diferentes de aquellas obtenidas con carbacol en ausencia de dicho tratamiento ( $13,9 \pm 1,3$  frente a  $13,1 \pm 1,3$  y  $8 \pm 1,23$  frente a  $7,8 \pm 1$  % de la liberación de amilasas respecto al total para las concentraciones de carbacol 3 y 0,3  $\mu$ M, respectivamente); sin embargo, el tratamiento con exoenzima C3 causó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la secreción de amilasas estimulada por CCK-8 a la concentración 0,1nM ( $11 \pm 1,6$  frente a  $6,7 \pm 1,4$  % de la liberación de amilasas respecto al total) en tanto que redujo, aunque no significativamente, la respuesta a 30pM de CCK-8 ( $5,1 \pm 1,9$  frente a  $4 \pm 0,6$  % de la liberación de amilasas respecto al total sobre la secreción basal) (figura 44).

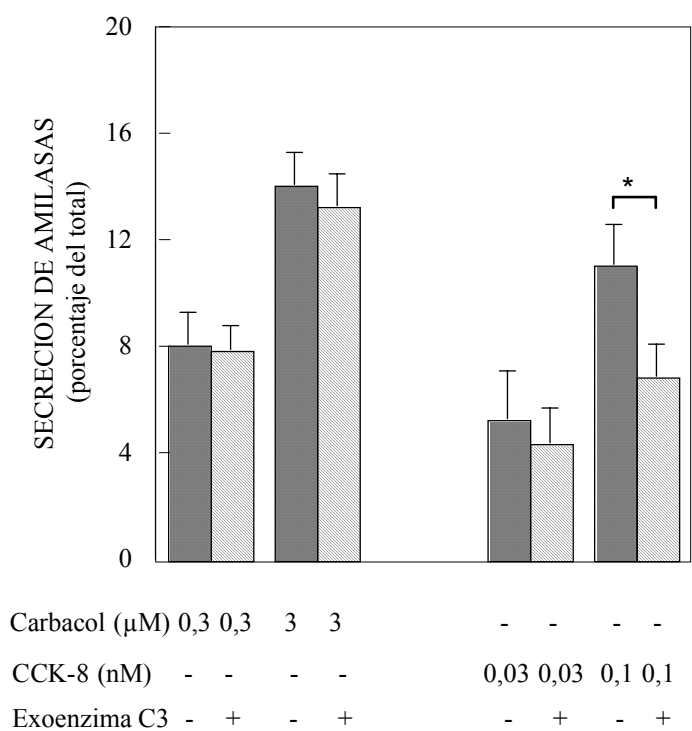


FIGURA 44. Efecto del carbacol (0,3 y 3 $\mu$ M) y la CCK-8 (0,03 y 0,1nM) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata pretratados o no con la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* (25 $\mu$ g/ml). Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal (n=8). El valor de la secreción basal fue del  $3,5 \pm 0,5$  y  $3,3 \pm 0,6$  % de la liberación de amilasas respecto al total para los grupos experimentales incubados en ausencia y presencia de exoenzima C3.

Cuando estudiamos el efecto de la exoenzima C3 en la curva concentración-efecto de la CCK (1pM-10nM), comprobamos que la exoenzima C3 disminuye la respuesta a la CCK-8 en un  $33 \pm 3\%$  (figura 45). El efecto de la exoenzima C3 se produjo únicamente en la eficacia de la CCK-8 para producir secreción de amilasas, ya que la EC50 fue muy similar en acinos pancreáticos tratados o no con la exoenzima C3 ( $13,4 \pm 1,5$  frente a  $10,5 \pm 1,9$  pM,

respectivamente,  $n=8$ ). El perfil bifásico de la curva concentración-efecto para la CCK tampoco sufrió alteración alguna.

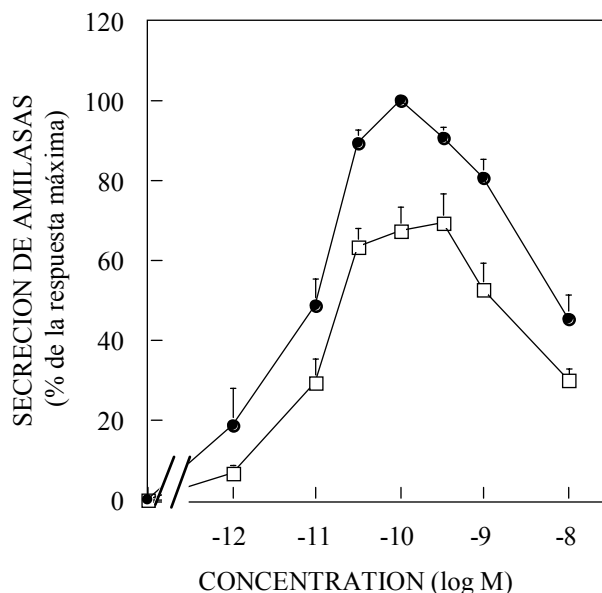


FIGURA 45. Curva concentración-efecto de la CCK-8 (círculos cerrados) y CCK-8 + exoenzima C3 (25 $\mu$ g/ml) (cuadrados abiertos) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal ( $n=8$ ). El valor de la secreción basal fue del  $4,4 \pm 0,4$  y de  $4,9 \pm 0,4$  % de la liberación de amilasas respecto al total para las curvas de CCK-8 y de CCK-8 + exoenzima C3, respectivamente.

La unión del carbacol o la CCK a su receptor produce la activación de la PLC, con producción de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> y DAG, que provocan el incremento en la concentración de calcio intracelular y la activación de la PKC, respectivamente, y la secreción enzimática (Jensen, 1994; Yule y Williams, 1994). En el capítulo III comprobamos que la estimulación de acinos pancreáticos con TPA, que activa a la PKC, y con el ionóforo del calcio A23187 produce un incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina. Para investigar el efecto de la inactivación de Rho en la respuesta provocada por la activación de la PKC o el incremento en la concentración de calcio intracelular, estudiamos el efecto de la exoenzima C3 en la respuesta a la estimulación de células acinares pancreáticas de rata con el éster de forbol, TPA, y con el ionóforo del calcio A23187.

El tratamiento de las células acinares con la concentración que produce el efecto máximo, 10 $\mu$ M, y la EC<sub>50</sub>, 0,1 $\mu$ M, de TPA durante 30 minutos provocó un incremento en la secreción de amilasas del  $8,4 \pm 2,7$  y  $6,1 \pm 1,7$  % de la liberación de amilasas respecto al total,

respectivamente. El tratamiento de células acinares pancreáticas con exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* (25µg/ml) durante 2 horas redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) la secreción de amilasa estimulada por TPA, 10 y 0,1µM, en un  $61,8 \pm 8,9$  y  $42 \pm 7,4\%$ , respectivamente (figura 46).

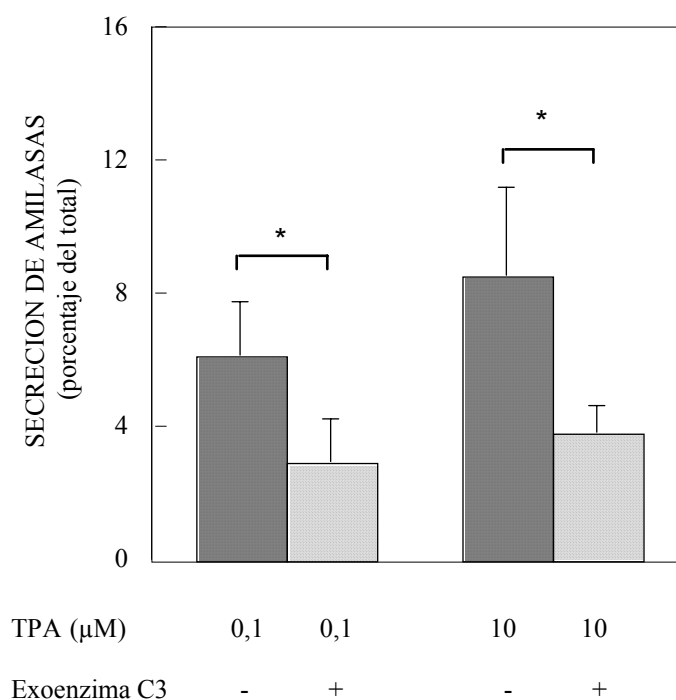


FIGURA 46. Efecto del éster de forbol TPA (0,1 y 10µM) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata pretratados o no con la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* (25µg/ml). Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal ( $n=5$ ). El valor de la secreción basal fue del  $3,5 \pm 0,5$  y  $3,3 \pm 0,6\%$  de la liberación de amilasas respecto al total para los grupos experimentales incubados en ausencia y presencia de exoenzima C3.

El tratamiento de células acinares pancreáticas con el ionóforo del calcio A23187 (1µM) produjo un incremento en la secreción de amilasas del  $5,5 \pm 1,1 \%$  de la liberación de amilasas respecto al total. El tratamiento de las células acinares con la exoenzima C3 (25µg/ml) no tuvo ningún efecto en la secreción de amilasas estimulada por el A23187 (1µM) (figura 47).

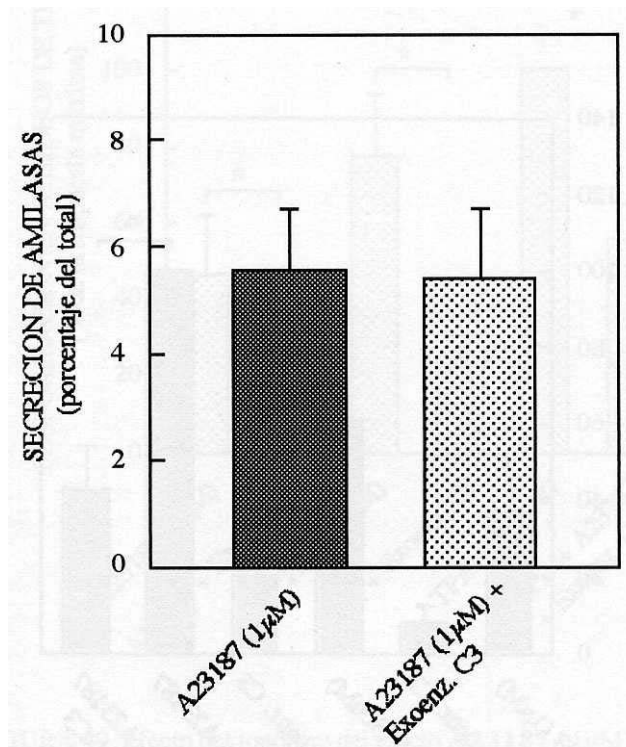


FIGURA 47. Efecto del ionóforo del calcio **A23187** (1μM) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata pretratados o no con la **exoenzima C3** de *Clostridium botulinum* (25μg/ml). Los resultados representados en la figura son la media ± EEM sobre el basal (n=5). El valor de la secreción basal fue del  $3,5 \pm 0,5$  y  $3,3 \pm 0,6\%$  de la liberación de amilasas respecto al total para los grupos experimentales incubados en ausencia y presencia de exoenzima C3.

En el capítulo III se estudió el efecto de la estimulación de acinos pancreáticos de rata con TPA, a la concentración efectiva 50 para fosforilación de proteínas, 30nM, el A23187 (1μM) y el efecto sinérgico entre ambos activadores. El tratamiento de las células acinares pancreáticas con la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* redujo en un  $68,8 \pm 8,2\%$  y un  $66 \pm 7,7\%$  la fosforilación de FAK y paxilina estimulada por TPA (30nM) y en un  $84,8 \pm 8,6\%$  y un  $89 \pm 7\%$  la fosforilación de FAK y paxilina mediada por A23187 (1μM). Además redujo la respuesta estimulada por TPA (30nM) y A23187 (1μM) en un  $57 \pm 12\%$  para la FAK y un  $45 \pm 7\%$  para la paxilina (figuras 48 y 49)

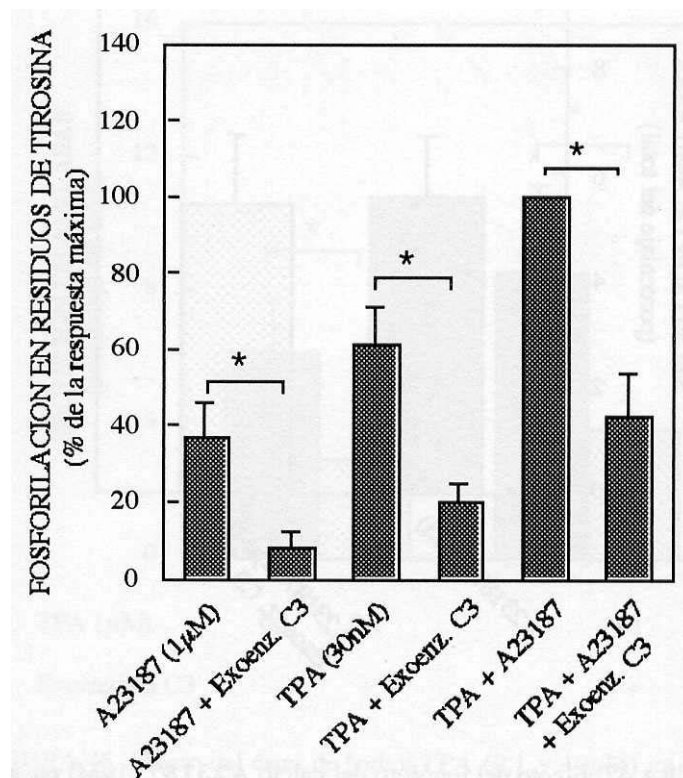


FIGURA 48. Efecto del ionóforo del calcio **A23187** (1µM), **TPA** (30nM) y **A23187** (1µM) + **TPA** (30nM) en la fosforilación en tirosina de la **FAK** en acinos pancreáticos de rata pretratados o no con **exoenzima C3** de *Clostridium botulinum*. Los resultados se representan como la media ± EEM y se expresan como porcentaje del incremento en fosforilación causado por A23187 y TPA conjuntamente (n=4).

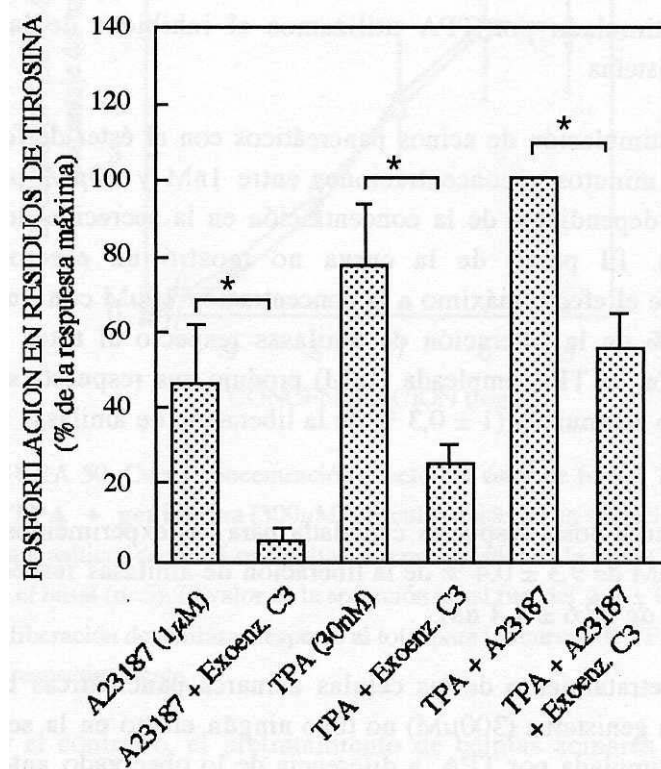


FIGURA 49. Efecto del ionóforo del calcio **A23187** (1µM), **TPA** (30nM) y **A23187** (1µM) + **TPA** (30nM) en la fosforilación en tirosina de la **paxilina** en acinos pancreáticos de rata pretratados o no con **exoenzima C3** de *Clostridium botulinum*. Los resultados se representan como la media ± EEM y se expresan como porcentaje del incremento en fosforilación causado por A23187 y TPA conjuntamente (n=4).

### 5.3.5. PAPEL DE LAS TIROSINAS CINASAS EN LA RESPUESTA A LA ESTIMULACION CON TPA

Para estudiar el efecto de las tirosinas cinasas en la secreción de amilasas y en la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por TPA utilizamos el inhibidor de las tirosinas cinasas, genisteína.

La estimulación de acinos pancreáticos con el éster de forbol TPA durante 30 minutos a concentraciones entre 1nM y 10µM produce un incremento dependiente de la concentración en la secreción de amilasas, (figura 50). El perfil de la curva no mostró un efecto bifásico, alcanzándose el efecto máximo a la concentración 10µM con un efecto de  $9,2 \pm 2,2$  % de la liberación de amilasas respecto al total. La menor concentración de TPA empleada (1nM)



produjo una respuesta similar a la secreción no estimulada ( $1 \pm 0,3$  % de la liberación de amilasas respecto al total).

La curva dosis-respuesta calculada para los experimentos con TPA mostró un EM de  $9,3 \pm 0,4$  % de la liberación de amilasas respecto al total y una EC<sub>50</sub> de  $28,6 \pm 1,4$  nM.

El pretratamiento de las células acinares pancreáticas durante 30 minutos con genisteína ( $300\mu\text{M}$ ) no tuvo ningún efecto en la secreción de amilasas estimulada por TPA, a diferencia de lo observado anteriormente para el carbacol o la CCK. La curva dosis-respuesta calculada para los experimentos de TPA en presencia de  $300\mu\text{M}$  de genisteína mostró la inexistencia de modificaciones tanto en el EM ( $9,4 \pm 0,7$  % de la liberación de amilasas respecto al total) como en la EC<sub>50</sub> ( $29,1 \pm 1,9$  nM).

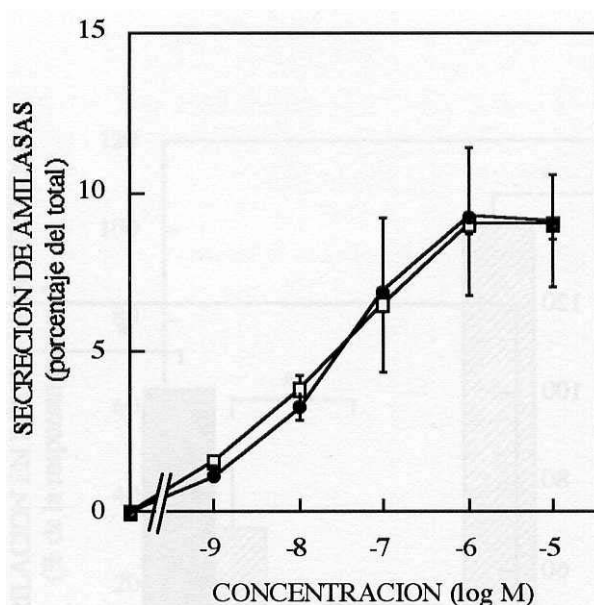


FIGURA 50. Curva concentración-efecto del éster de forbol TPA (círculos cerrados) y TPA + genisteína ( $300\mu\text{M}$ ) (círculos abiertos) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal ( $n=5$ ). El valor de la secreción basal fue del  $4,5 \pm 0,7$  y de  $5,5 \pm 0,6$ % de la liberación de amilasas respecto al total para las curvas de TPA y de TPA + genisteína, respectivamente.

Por el contrario, el pretratamiento de células acinares pancreáticas con genisteína ( $300\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos causó una reducción del  $88 \pm 10\%$  y  $87 \pm 5\%$  de la respuesta estimulada por TPA  $1\mu\text{M}$  (efecto máximo en fosforilación de proteínas) en la fosforilación de FAK y paxilina, respectivamente, y del  $89 \pm 8\%$  y  $95 \pm 6\%$  de la respuesta estimulada por TPA

30nM (EC50 en fosforilación de proteínas ) en la fosforilación de FAK y paxilina, respectivamente (figuras 51 y 52).

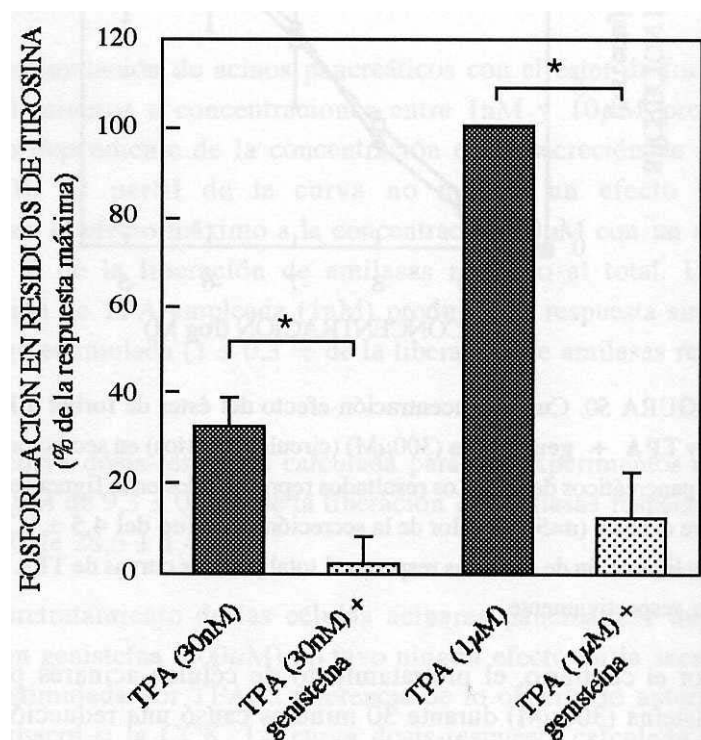


FIGURA 51. Efecto del éster de forbol TPA (30nM y 1µM) en la fosforilación en tirosina de la FAK en acinos pancreáticos de rata pretratados o no con genisteína (300µM). Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM y se expresan como porcentaje del incremento en fosforilación causado por TPA (1µM) (n=3). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida sin genisteína ( $p < 0,05$ ).

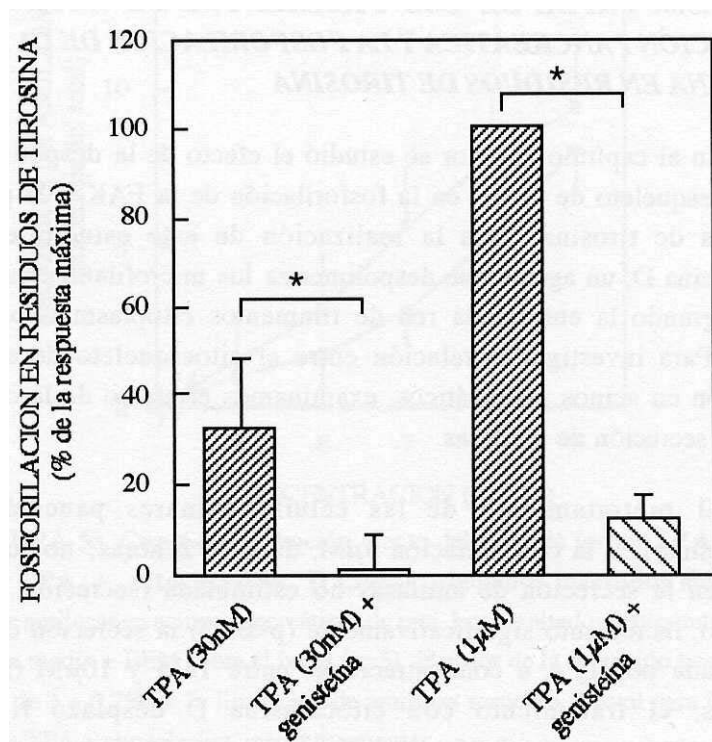


FIGURA 52. Efecto del éster de forbol TPA (30nM y 1µM) en la fosforilación en tirosina de la **paxilina** en acinos pancreáticos de rata pretratados o no con genisteína (300µM). Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM y se expresan como porcentaje del incremento en fosforilación causado por TPA (1µM) (n=3). \* Indica diferencias estadísticamente significativas respecto a la respuesta obtenida sin genisteína ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.6. PAPEL DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA EN LA SECRECIÓN PANCREÁTICA Y LA FOSFORILACION DE LA FAK Y LA PAXILINA EN RESIDUOS DE TIROSINA

En el capítulo anterior se estudió el efecto de la despolimerización del citoesqueleto de actina en la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina. Para la realización de este estudio empleamos citocalasina D, un agente que despolimeriza los microfilamentos de actina, desintegrando la entramada red de filamentos citoplasmáticos (Cooper, 1987). Para investigar la relación entre el citoesqueleto de actina y la secreción en acinos pancreáticos, examinamos el efecto de la citocalasina D en la secreción de amilasas.

El pretratamiento de las células acinares pancreáticas con citocalasina D a la concentración 3µM, durante 2 horas, no tuvo ningún efecto en la secreción de amilasas no estimulada (secreción basal); sin embargo, incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) la secreción

de amilasas estimulada por TPA a concentraciones entre 1nM y 10 $\mu$ M (figura 53). Además, el tratamiento con citocalasina D desplazó ligera pero significativamente ( $p < 0,05$ ) hacia la izquierda la curva concentración efecto del TPA en secreción de amilasas (figura 53). El valor de la EC<sub>50</sub> y el EM calculado para la curva de TPA en presencia o no de citocalasina D se representa en la tabla 4.

Por el contrario, el pretratamiento de células acinares pancreáticas con citocalasina D (3 $\mu$ M) inhibió completamente la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por TPA (30nM) (figura 54).

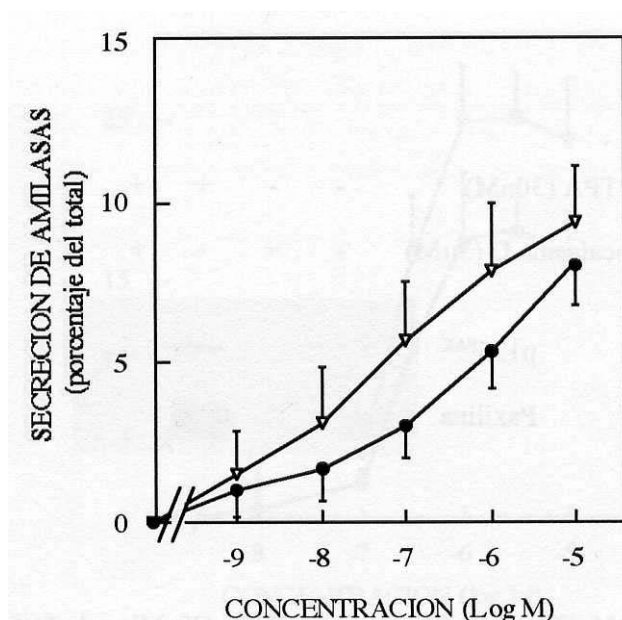


FIGURA 53. Curva concentración-efecto del éster de forbol TPA (circuitos cerrados) y TPA + citocalasina D (3 $\mu$ M) (triángulos invertidos abiertos) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal ( $n=5$ ). El valor de la secreción basal fue del  $3,7 \pm 0,5$  y de  $3 \pm 0,7\%$  de la liberación de amilasas respecto al total para las curvas de TPA y de TPA + citocalasina, respectivamente.

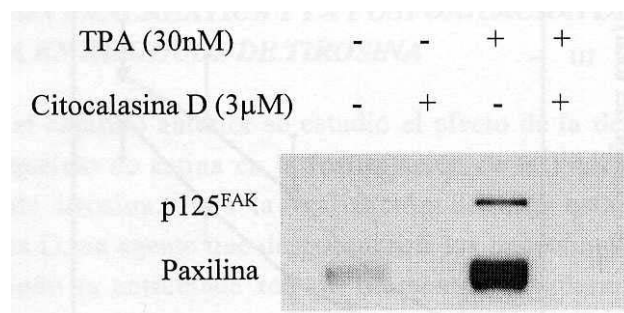


FIGURA 54. Efecto del éster de forbol **TPA** (30nM) en la fosforilación en tirosina de la **FAK** y la **paxilina** en acinos pancreáticos de rata pretratados o no con **citocalasina D** (3 $\mu$ M). La imagen muestra un experimento representativo de otros 4.

En el capítulo IV se demostró que el pretratamiento de células acinares pancreáticas con citocalasina D (3 $\mu$ M) inhibió completamente la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol (1 $\mu$ M) o CCK (0,1nM).

La figura 55 representa la curva concentración-efecto de la secreción de amilasas estimulada por carbacol, en el rango de concentraciones 10nM-10 $\mu$ M, en presencia y en ausencia de citocalasina D 3 $\mu$ M, en células acinares pancreáticas de rata. El pretratamiento de las células acinares durante 2 horas con citocalasina D 3 $\mu$ M provocó un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en la secreción de amilasas estimulada por carbacol. La EC50 calculada para la curva dosis-respuesta para el carbacol previo tratamiento con citocalasina D 3 $\mu$ M no resultó ser diferente de la calculada para el carbacol en ausencia del agente inhibidor.

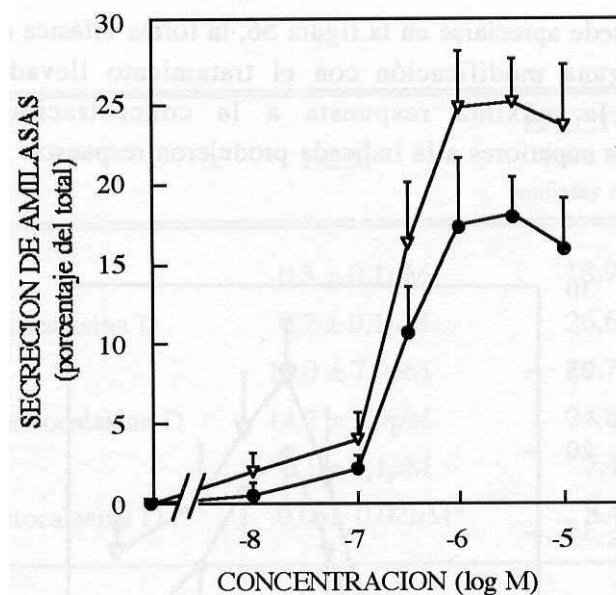


FIGURA 55. Curva concentración-efecto del **carbacol** (círculos cerrados) y **carbacol + citocalasina D** ( $3\mu\text{M}$ ) (triángulos invertidos abiertos) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal ( $n=5$ ). El valor de la secreción basal fue del  $3,7 \pm 0,5$  y de  $3 \pm 0,7\%$  de la liberación de amilasas respecto al total para las curvas de carbacol y de carbacol + citocalasina D, respectivamente.

Los valores de EM y la  $EC_{50}$  calculados para las curvas concentración-respuesta del carbacol realizadas en acinos pancreáticos de rata pretratados durante dos horas en ausencia y presencia de citocalasina D  $3\mu\text{M}$  se representan en la tabla 4.

El pretratamiento de acinos pancreáticos durante dos horas con citocalasina D ( $3\mu\text{M}$ ) provocó un incremento estadísticamente significativo en el EM ( $p<0,05$ ) en la secreción de amilasas estimulada por CCK-8, mientras que la  $EC_{50}$  no sufrió modificación alguna (figura 56). Los valores de  $E_{\text{max}}$  y la  $EC_{50}$  calculados para las curvas concentración-respuesta para la CCK-8 realizadas en acinos pancreáticos de rata pretratados durante dos horas en ausencia y presencia de citocalasina D  $3\mu\text{M}$  se representan en la tabla 4.

Como puede apreciarse en la figura 56, la forma bifásica de la curva no sufrió ninguna modificación con el tratamiento llevado a cabo, obteniéndose la máxima respuesta a la concentración  $100\text{pM}$ . Concentraciones superiores a la indicada produjeron respuestas inferiores.

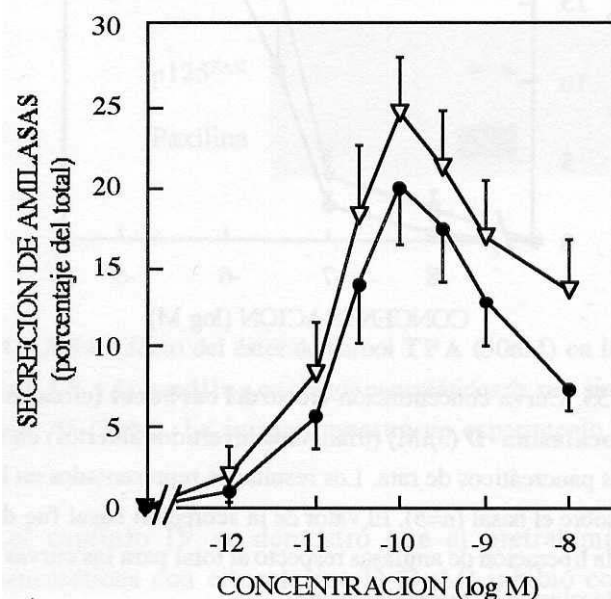


FIGURA 56. Curva concentración-efecto de la **CCK-8** (círculos cerrados) y **CCK-8 + citocalasina D** ( $3\mu\text{M}$ ) (triángulos invertidos abiertos) en secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata. Los resultados representados en la figura son la media  $\pm$  EEM sobre el basal ( $n=5$ ). El valor de la secreción basal fue del  $3,7 \pm 0,56$  y de  $3 \pm 0,7\%$  de la liberación de amilasas respecto al total para las curvas de CCK y de CCK + citocalasina D, respectivamente.

	EC50	EFEECTO MAXIMO (%de la liberación de amilasas respecto al total)
CCh	$0,3 \pm 0,1\mu\text{M}$	$18,90 \pm 1,84$
CCh + citocalasina D	$0,2 \pm 0,1\mu\text{M}$	$26,66 \pm 2,23^*$
CCK-8	$18,0 \pm 7,9\text{pM}$	$20,72 \pm 2,22$
CCK-8 +citocalasina D	$14,2 \pm 5,9\text{pM}$	$24,87 \pm 2,36^*$
TPA	$0,1 \pm 0,1\mu\text{M}$	$7,45 \pm 1,1$
TPA + citocalasina D	$0,03 \pm 0,02\mu\text{M}^*$	$8,46 \pm 0,8^*$

TABLA 4: Parámetros de las curvas concentración-efecto para la CCK-8, el carbacol y el TPA previo tratamiento con citocalasina D ( $3\mu\text{M}$ ). \* Refleja la existencia de diferencias estadísticamente significativas respecto a la curva sin el inhibidor, ( $p<0,05$ ).

#### 5.4. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados presentados a lo largo del presente estudio, que investigan los mecanismos intracelulares que median la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina en respuesta a carbacol y CCK, nos ha permitido diseñar el esquema que se presenta en la página siguiente (figura 57).

Los resultados mostrados en el capítulo III demuestran que la estimulación de células acinares pancreáticas de rata con carbacol o CCK-8 produce un rápido incremento en la fosforilación de la FAK y la paxilina. La ocupación del receptor muscarínico M<sub>3</sub> y del receptor CCK<sub>A</sub>, por el carbacol y la CCK-8 respectivamente, provoca la activación de la PLC dando lugar a la formación de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> y DAG, que, a su vez, provocan la movilización de calcio intracelular y la activación de la PKC. En el capítulo III demostramos que la activación de la PKC, con el éster de forbol TPA, e incrementos en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, con el ionóforo del calcio A23187, estimula la fosforilación de la FAK y la paxilina en acinos pancreáticos de rata (figura 57). El efecto del carbacol o la CCK en la fosforilación de la FAK y la paxilina está mediado tanto por mecanismos intracelulares dependientes como independientes de la PKC y la concentración de calcio intracelular. Esta afirmación se basa en que la combinación del inhibidor de la PKC, GF109203X, y del bloqueo de los incrementos en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, con tapsigargina en medio libre de calcio, no inhibió completamente la respuesta al carbacol o la CCK (figura 57).

Por otro lado, nuestros resultados han demostrado que la GTPasa Rho participa en la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol y CCK, ya que el tratamiento de células acinares pancreáticas con la exoenzima C3, que inactiva Rho específicamente, inhibe la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol y CCK.



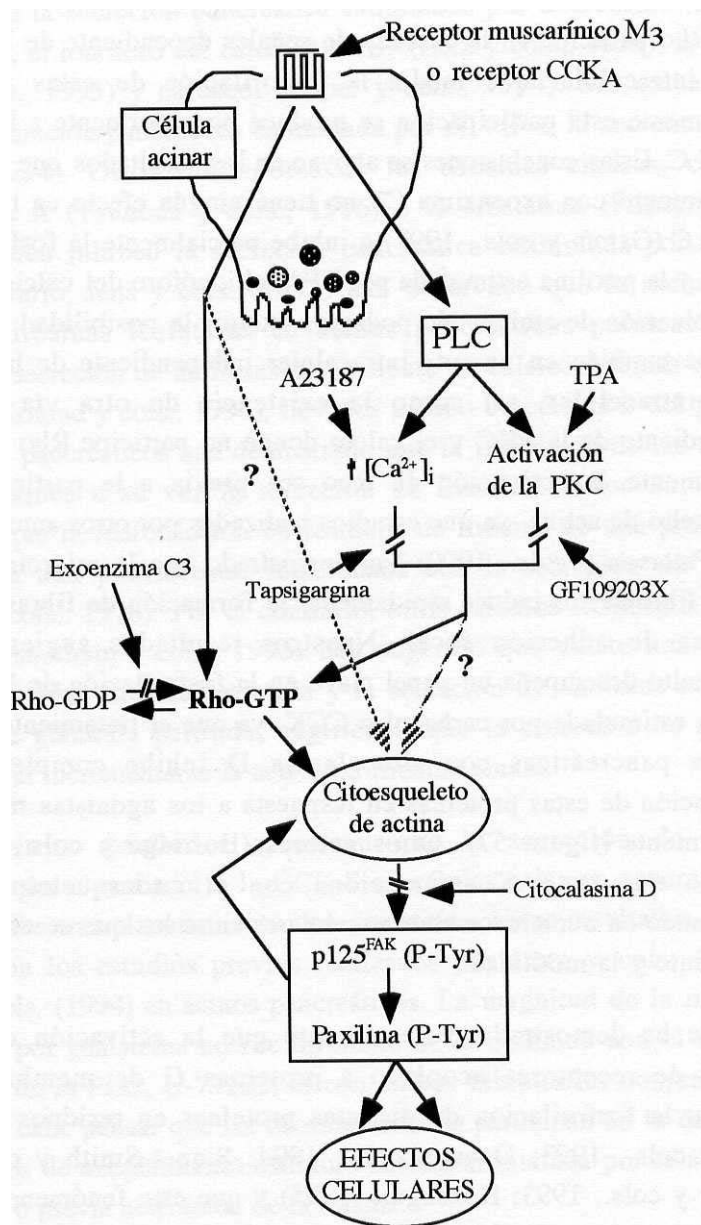


FIGURA 57. Esquema de las posibles rutas intracelulares que median la fosforilación de la tirosina cinasa FAK y la proteína del citoesqueleto paxilina, en residuos de tirosina (P-Tyr), tras la activación de los receptores muscarínicos M<sub>3</sub> y CCK<sub>A</sub> en acinos pancreáticos de rata.

Rho participa en la cascada de señales dependiente de la PKC y el calcio intracelular que media la fosforilación de estas proteínas y posiblemente esta participación se produce posteriormente a la activación de la PLC. Estas conclusiones se apoyan en los resultados que indican que el tratamiento con exoenzima C3 no tiene ningún efecto en la activación de la PLC (García y cols., 1997) e inhibe parcialmente la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada

por TPA, el ionóforo del calcio A23187 o la combinación de ambos. No podemos excluir la posibilidad de que Rho participe también en un ruta intracelular independiente de la PKC y el calcio intracelular, así como la existencia de otra vía intracelular independiente de la PKC y el calcio donde no participe Rho (figura 57). Posiblemente, la activación de Rho sea previa a la participación del citoesqueleto de actina, ya que estudios realizados por otros autores (Ridley, 1995; Paterson y cols., 1990) han demostrado que la microinyección de Rho en fibroblastos induce rápidamente la formación de fibras de tensión y placas de adhesión focal. Nuestros resultados sugieren que el citoesqueleto desempeña un papel clave en la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol o CCK, ya que el tratamiento de células acinares pancreáticas con citocalasina D inhibe completamente la fosforilación de estas proteínas en respuesta a los agonistas mencionados anteriormente (figura 57). Otros autores (Burrige y cols., 1992) han sugerido que la FAK interacciona con el citoesqueleto de actina participando en numerosos efectos celulares entre los que se encuentran el crecimiento y la motilidad.

Se ha demostrado recientemente que la activación de un gran número de receptores acoplado a proteínas G de membrana puede estimular la fosforilación de distintas proteínas en residuos de tirosina (Lutz y cols., 1993; Duan y cols., 1994; Sinnet-Smith y cols., 1993; Zachary y cols., 1993; Rozengurt, 1995) y que este fenómeno podría ser importante en la mediación de numerosos efectos celulares.

El papel de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en el efecto de distintos secretagogos en la secreción pancreática exocrina se ha estudiado recientemente con resultados contradictorios y poco clarificadores. Estos estudios han demostrado que la genisteína, un inhibidor de la actividad de las proteínas tirosinas cinasas, puede inhibir parcialmente la secreción pancreática estimulada por bombesina (Piiper y cols., 1994), el ionóforo del calcio A23187 (Lutz y cols., 1993), la CCK-8 (Lutz y cols., 1993) y carbacol (Piiper y cols., 1994). Sin embargo, no inhibe la secreción pancreática estimulada por el VIP o la secretina (Duan y cols., 1994). Otros inhibidores de las tirosinas cinasas, como la herbimicina A (Tsunoda y cols., 1996) o la erbstatina (Piiper y cols., 1994) también inhiben la secreción pancreática estimulada por CCK-8. Por el contrario, Jena y cols. (1991) han observado que la inclusión de proteínas tirosinas fosfatasas en acinos pancreáticos permeabilizados estimula la secreción de amilasas dependiente de calcio. Además recientes estudios, (Konrad y cols., 1996), llevados a cabo en células  $\beta$  del páncreas y en islotes pancreáticos han demostrado que la inhibición de las tirosinas cinasas bloquea a su vez la secreción de insulina. Estos autores han propuesto que la fosforilación en residuos de tirosina de una proteína no identificada aún podría estar relacionada con la secreción de insulina (Konrad y cols., 1996). Por el contrario, otros estudios (Kinoshita y cols., 1996; Purushotham y cols., 1995) han sugerido que existe una relación entre la actividad

tirosina fosfatasa y la secreción de amilasas en células acinares de glándula parótida, sugiriendo que la secreción de amilasas disminuye al incrementarse la actividad tirosina cinasa.

Nuestros resultados muestran que la secreción de amilasas estimulada por el carbacol o la CCK-8 en células acinares pancreáticas de rata se inhibe tras el tratamiento con genisteína. Estos resultados están de acuerdo con los estudios previos realizados por Lutz y cols. (1993) y Piiper y cols. (1994) en acinos pancreáticos. La magnitud de la inhibición provocada por genisteína no fue diferente de la obtenida con el inhibidor específico de la PLC, U-73122, ni con ambos inhibidores conjuntamente, por lo que cabe pensar que las tirosinas cinasas participan en la cascada de mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción iniciada por la activación de la PLC o previa activación de la misma.

Igualmente, la genisteína inhibe la secreción de amilasas estimulada por el agonista de la CCK-8, JMV-180, agente cuyo efecto, como se comentó en el capítulo I y se demuestra con la falta de efecto que el U-73122 muestra en su respuesta secretora, no está mediado por la PLC. Estos resultados parecen indicar que o bien es necesaria la actividad tirosina cinasa inmediatamente después de la ocupación del receptor de la CCK o bien las tirosinas cinasas participan en diferentes vías intracelulares. Estudios realizados por Umemori y cols. (1997) han demostrado que la fosforilación en residuos de tirosina de la subunidad  $G_{\alpha q/11}$  es necesaria para regular la activación de la proteína  $G_{q/11}$ , que media la respuesta a diferentes agonistas, entre ellos, el carbacol y la CCK (Yule y Williams, 1994).

Estudios llevados a cabo por Burridge y cols. (1988) y Rozengurt (1995) han puesto de manifiesto que la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina podría representar un importante papel en la mediación de un gran número de efectos celulares. En células acinares pancreáticas el pretratamiento con genisteína inhibe parcialmente la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina. El grado similar de inhibición de la secreción de amilasas y la fosforilación de ambas proteínas estimulada por carbacol y CCK-8 nos llevó a plantearnos si la fosforilación de la FAK y la paxilina en residuos de tirosina participaría en la secreción de amilasas estimulada por estos agonistas. Para investigar la posible relación entre la fosforilación de la FAK y la paxilina y la secreción enzimática en acinos pancreáticos llevamos a cabo tres aproximaciones: en primer lugar, estudiamos el papel de las GTPasas de la familia Rho en ambos procesos, fosforilación de FAK y paxilina y secreción enzimática, ya que, como hemos comprobado anteriormente, la activación de Rho es necesaria para la fosforilación de la FAK y la paxilina en acinos pancreáticos de rata. En segundo lugar, investigamos el papel de la genisteína en la activación de la secreción enzimática mediada por la PKC, ya que esta vía participa de un modo importante en la estimulación de la secreción enzimática con carbacol y

CCK-8 (Jensen, 1994; Yule y Williams, 1994) y en la fosforilación de la FAK y de la paxilina, como hemos demostrado en este trabajo. Por último, estudiamos el papel del citoesqueleto de actina en cada uno de los procesos, ya que como hemos podido comprobar, su integridad es necesaria para la fosforilación de la FAK y la paxilina en acinos pancreáticos de rata. Para llevar a cabo este último estudio empleamos la citocalasina D, agente que despolimeriza los filamentos de actina (Cooper, 1987).

Los resultados presentados en el capítulo IV demuestran que la estimulación con carbacol y CCK-8 de la fosforilación de la FAK y la paxilina, al igual que la estimulación por otros agentes (Hall, 1990; Jena y cols., 1991) es dependiente de la activación de Rho. Para examinar el papel de Rho en la secreción de amilasas estimulada por carbacol y CCK-8 utilizamos, al igual que al estudiar su implicación en la fosforilación de la FAK y la paxilina, la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, que inactiva Rho por ADP ribosilación en el residuo Asn<sup>41</sup> (Aktories y cols., 1987). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento de células acinares pancreáticas con exoenzima C3 careció de efecto en la secreción de amilasas estimulada por carbacol. Por el contrario, este tratamiento redujo el efecto máximo en secreción estimulado por CCK-8 en un 33%, un grado de reducción similar al observado en la fosforilación de la FAK y la paxilina. Los resultados obtenidos con la exoenzima C3, que muestran un grado similar de inhibición de la secreción de amilasas y la fosforilación de FAK y paxilina estimulada por CCK-8 apoyan la posible relación entre estos dos fenómenos tras la activación del receptor CCK<sub>A</sub>. Sin embargo, esto no puede afirmarse en el caso del carbacol, donde la reducción de la fosforilación de la FAK y la paxilina no corre paralela a una posible reducción en la secreción enzimática.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que la exoenzima C3 redujo la fosforilación de la FAK y la paxilina y también la secreción de amilasas estimulada por TPA en una grado similar; sin embargo, careció de efecto en la secreción de amilasas estimulada por el ionóforo del calcio mientras que redujo parcialmente su efecto en la fosforilación de FAK y paxilina. Los resultados obtenidos si bien muestran un paralelismo entre los efectos de la inhibición de Rho en la fosforilación de la FAK y la paxilina y la secreción de amilasas estimulada por TPA, son contradictorios en el efecto en la respuesta a los incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$ .

Por otro lado, nuestros resultados muestran que la genisteína inhibe la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por TPA pero carece de efecto en la secreción de amilasas estimulada por el mismo activador. Estos resultados coinciden con los observados por otros autores (Lutz y cols., 1993; Duan y cols., 1994) que han propuesto que los incrementos en

$[Ca^{2+}]_i$ , pero no la activación de la PKC, tras la ocupación del receptor  $CCK_A$ , están acoplados con la estimulación de la secreción enzimática mediada por tirosinas cinasas. En estos estudios, la genisteína carece de efecto en la secreción enzimática estimulada por TPA pero inhibe la secreción enzimática mediada por los incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$ . En otros estudios (Yule y cols., 1994) se observó que algunos inhibidores de las tirosinas cinasas, como la genisteína, la tirfostina A25 o el 2,5 dihidroxicinamato de metilo, bloquean el influx de calcio, sugiriéndose que estas alteraciones podrían ser las responsables de la reducción de la secreción de amilasas causada por estos inhibidores. En nuestro estudio no hemos ensayado el efecto de distintos inhibidores de las tirosinas cinasas en la secreción de amilasas y la fosforilación de FAK y paxilina estimulada por el ionóforo del calcio A23187 dado que el efecto del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  es de muy pequeña magnitud y podría dificultar el estudio de los efectos inhibidores.

En el capítulo anterior demostramos que la estimulación de células acinares pancreáticas con carbacol o CCK-8 necesita la integridad del citoesqueleto de actina para producir fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina. Este resultado es similar al observado para otros neuropéptidos en distintos sistemas celulares (Sinnott-Smith y cols., 1993; Leeb-Lundberg y cols., 1994; Shattil y cols., 1994). Por otro lado, estudios previos realizados en células acinares pancreáticas han mostrado que la activación de los receptores  $CCK_A$  con concentraciones supramáximas de ceruleína, un análogo de la CCK-8, produce una progresiva despolimerización de los microtúbulos y los microfilamentos, alteraciones que podrían explicar la inhibición de la secreción de amilasas causada por concentraciones supramáximas de CCK-8 (O'Konski y Pandol, 1993; Jungermann y cols., 1995). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento de células acinares pancreáticas con citocalasina D, que causa despolimerización de los microfilamentos de actina e inhibe completamente la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol y CCK-8, incrementó ligeramente la secreción de amilasas estimulada por estos secretagogos. El mismo resultado se observó al estudiar la respuesta a la activación de la PKC con TPA. Los resultados obtenidos con el estudio del efecto de la citocalasina D en la respuesta al carbacol, la CCK-8 o el TPA, junto con los observados al estudiar el efecto de la genisteína en la respuesta al TPA, evidencian que la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina no es necesaria para el proceso secretor estimulado por el carbacol o la CCK-8.

Nuestros resultados demuestran claramente que la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina no es un requisito necesario para la secreción enzimática estimulada por carbacol o CCK en acinos pancreáticos de rata. Esta afirmación se apoya en los siguientes hechos experimentales:

1. La inactivación de la GTPasa Rho inhibe en un 53 y un 58% la fosforilación de la FAK y la paxilina, respectivamente, estimulada por carbacol y sin embargo no produjo ninguna modificación en la secreción de amilasas estimulada por el mismo agonista.

2. El tratamiento de células acinares pancreáticas de rata con el inhibidor de las tirosinas cinasas, genisteína, inhibió significativamente la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina estimulada por el éster de forbol TPA; por el contrario el tratamiento con genisteína careció de efecto en la secreción de amilasas estimulada por este activador.

3. Por último, el tratamiento de acinos pancreáticos de rata con citocalasina D inhibe completamente la fosforilación de la FAK y la paxilina estimulada por carbacol, CCK o TPA en tanto que incrementó ligeramente la secreción de amilasas en respuesta a los agentes aludidos anteriormente.

Resultados obtenidos por otros autores en acinos pancreáticos indican que las GTPasas de bajo peso molecular Ras y Rab3D participan en la regulación de la exocitosis estimulada por diferentes agentes hormonales (Profrock y cols., 1992; Zimmermann P y cols., 1992; Zeuzem y cols., 1994; Ohnishi y cols., 1996). Asimismo, estudios realizados en otros sistemas celulares demuestran que la GTPasa de bajo peso molecular Rho es necesaria para el proceso secretor de la  $\beta$ -hexosaminidasa en mastocitos (Price y cols., 1995; Mariot y cols., 1996). Nuestros resultados demuestran que la GTPasa Rho participa en el mecanismo secretor que acontece tras la ocupación de los receptores CCK<sub>A</sub>, pero no tras la ocupación de los receptores M<sub>3</sub>, en células acinares pancreáticas de rata. Estos resultados aportan evidencias de que Rho participaría en dos cascadas de señales intracelulares paralelas pero diferentes, la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y la paxilina y la secreción enzimática, en el páncreas exocrino.

CONCLUSIONES

1) La ocupación de los receptores de membrana  $CCK_A$ , de alta y baja afinidad, y de los muscarínicos  $M_3$ , presentes en células acinares pancreáticas de rata, induce fosforilación, por vías dependientes e independientes de la activación de la proteína cinasa C y de la movilización de calcio intracelular, de residuos de tirosina presentes en la tirosina cinasa FAK y en su sustrato paxilina.

2) La fosforilación en residuos de tirosina de FAK y paxilina estimulada por la ocupación de los receptores  $M_3$  y  $CCK_A$  requiere el mantenimiento de la organización del citoesqueleto de actina. Adicionalmente, las fosforilaciones aludidas son dependientes, al menos parcialmente, de la activación de la GTPasa, Rho.

3) La fosforilación en residuos de tirosina de la proteína tirosina cinasa FAK y de la proteína del citoesqueleto paxilina no parece ser un requisito necesario para el inicio y mantenimiento del proceso secretor enzimático que normalmente se produce en las células acinares pancreáticas como consecuencia de la ocupación de los receptores  $M_3$  y  $CCK_A$ .



BIBLIOGRAFÍA

- Abedi H, Dawes KE y Zachary I. (1995) Differential effects of platelet-derived growth factor BB on p125 focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation and on cell migration in rabbit aortic vascular smooth muscle cells and Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*; 270: 11367-11376.
- Akiyama SK, Yamada SS, Yamada KM y LaFlamme SE. (1994) Transmembrane signal transduction by integrin cytoplasmic domains expressed in single-subunit chimeras. *J Biol Chem*; 269: 15961-15964.
- Aktorics K, Weller U y Chatwal GS. (1987) Clostridium botulinum type C produces a novel DP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin. *FEBS Lett*; 212: 109-113.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. (1989) The cytoskeleton. En: *Molecular biology of the cell*. Second edition. Ed: Robertson M. Garland Publishing, Inc. New York; pp 613-680.
- Alcón S, Rosado JA, García LJ, Pariante JA, Salido GM y Pozo MJ. (1996) Secretin potentiates guinea pig pancreatic response to cholecystokinin by a cholinergic mechanism. *Can J Physiol Pharmacol*; 74: 1342-1350.
- Allan VJ y Kreis TE. (1986) A microtubule-binding protein associated with membranes of the Golgi apparatus. *J Cell Biol*; 103: 2229-2239.
- Allen RD. (1987) The microtubule as an intracellular engine. *Sci Am*; 256: 42-49.
- Amos LA. (1985) Estructure of muscle filaments studied by electron microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys.Chem*; 14: 291-313.
- Amos LA y Baker TS. (1979) The three dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature*; 279: 607-612.
- Anastasi A, Erspamer V y Enean R. (1968) Isolation and amino acid sequence of caerulein, the active decapeptide of the skin of *Hyla caerulea*. *Arch Biochem Biophys*; 125: 57-68.
- Ansah T-A, Molla A y Katz S. (1984) Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in pancreatic acinar plasma membranes. *J Biol Chem*; 259: 13442-13450.
- Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O. (1993) Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell*; 74: 237-244.

- Ashendel CL. (1985) The forbol ester receptor: a phospholipid regulated protein-kinase. *Biochim Biophys Acta*; 822: 219-242.
- Asselin J, Larose L y Morisset J. (1987) Short-term cholinergic desensitization of rat pancreatic secretory response. *Am J Physiol*; 252: G392-G397.
- Barnard EA. (1988) Separating receptor subtypes from their shadows. *Nature*; 335: 301-302.
- Batthey y Wada E. (1991) Two distinct receptors for mammalian bombesin-like peptides. *Trends Neurosci*; 14:524-527.
- Baur H, Kasperek S y Pfaff E. (1975) Criteria of viability of isolated liver cells. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem*; 356: 827-838.
- Bellis SL, Miller JT y Turner CE. (1995) Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem*; 270: 17437-17441.
- Berridge MJ e Irvine AJ. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*; 341:197-205.
- Bialojan C, y Takai A. (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, akadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem J*; 256: 283-290.
- Bidgman PC y Reese TS. (1984) The structure of cytoplasm in directly frozen cultured cells. 1. Filamentous meshworks and the cytoplasmic ground substance. *J Cell Biol*; 86: 212-234.
- Bissonette M, Kuhn D y De Lanerolle P. (1989) Purification and characterization of myosin light-chain kinase from the rat pancreas. *Biochem J*; 258: 739-747.
- Blenis J. (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 5889-5892.
- Bloom W y Fawcett DW. (1981) Páncreas. En: *Tratado de histología*. Ed: Labor SA. pp 728-744.
- Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A y Grinpukel S. (1990) Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol*; 27: 408-415.
- Bockman DE. (1993) Anatomy of the pancreas. En: *The pancreas: biology, pathobiology and disease*. Ed: Go VLW. Raven Press, New York. pp 1-8.
- Boden G, Sivitz MC, Owen OE, Essa-Koumar N y Landor JH. (1975) Somatostatin suppresses secretin and pancreatic exocrine secretion. *Science*; 90: 163-164.

- Bolen JB. (1993) Nonreceptor tyrosine protein kinases. *Oncogene*; 8: 2025-2031.
- Bommelaer G, Rozental G, Bernier C, Vaysse N y Ribet A. (1981) Action of secretagogues on amylase release from dog pancreatic acini. *Digestion*; 21: 248-254.
- Bonner TI, Young AC, Brann MR y Buckley NJ. (1988) Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron*; 1: 403-410.
- Bos JL. (1995) A target for phosphoinositide 3-kinase: Akt/PKB. *Trends Biochem Sci*; 20: 441-442.
- Bragado MJ, Groblewski GE y Williams JA. (1997) p70<sup>S6k</sup> is activated by CCK in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 273: 101-109.
- Bray D, Heath Jy Moss D. (1986) The membrane-associated "cortex" of animal cells: its structure and mechanical properties. *J Cell Sci., suppl*; 4: 71-78.
- Bray D y White JG. (1988) Cortical flow in animal cells. *Science* 239: 883-888.
- Brown MC y Turner CE. (1997) Paxillin. A signal transduction crossroads? *Insights*; 3: 1-2.
- Brown JC, Harper AA y Scratcherd T. (1967) Potentiation of secretin stimulation of the pancreas. *J Physiol*; 190: 519-530.
- Brown MC, Perrotta JA y Turner CE. (1996) Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol*; 135: 1109-1123.
- Bruzzone R. (1990) The molecular basis of enzyme secretion. *Gastroenterology*; 99: 1157-1176.
- Bruzzone R, Trimble ER, Gjinouci A y Renold AE. (1984) Glucose-insulin interactions on exocrine secretion from the perfused rat pancreas. *Gastroenterology*; 87: 1305-1312.
- Burnham DB. (1985) Characterization of Ca<sup>2+</sup>-activated protein phosphatase activity in exocrine pancreas. *Biochem J*; 231: 335-341.
- Burnham DB, McChesney DJ, Thurston KC, Williams JA. (1984) Interaction of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide on function of mouse pancreatic acini in vitro. *J Physiol (Lond)*; 349: 475-482.
- Burnham DB, Soling H-D y Williams JA. (1988) Evaluation of myosin light chain phosphorylation in isolated pancreatic acini. *Am J Physiol*; 254: G130-G134.

- Burridge K. (1981) Are stress fibers contractile? *Nature*; 294: 691-692.
- Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G y Turner C. (1988) Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol*; 4: 487-525.
- Burridge K, Turner CE y Romer LH. (1992) Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125<sup>FAK</sup> accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol*; 119: 893-903.
- Byers HR y Fujiwara K. (1982) Stress fibers in cell *in situ*: immunofluorescence visualization with anti-actin, anti-myosin and anti-alpha-actinin. *J Cell Biol*; 93: 804-811..
- Calalb MB, Polte TR y Hanks SK. (1995) Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*; 15 (2): 954-963.
- Camello C, Lajas AI, González A, Camello PJ y Pariente JA. (1997) Histamine does not potentiate cyclic AMP-mediated amylase secretion in the guinea-pig pancreatic acinar cells. *Gen Pharmac*; 29: 211-215.
- Camello PJ y Salido GM. (1993) Inhibitory interactions between stimulus-secretion pathways in the exocrine rat pancreas. *Biochem Pharmacol*; 46: 1005-1009.
- Camello PJ, Wisdom D, Singh J, Francis LP y Salido GM. (1993) Effect of phorbol ester on vagal stimulation and acetylcholine-evoked exocrine pancreatic secretion and cytosolic free calcium in the rat. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*; 101: 133-139.
- Campbell Gs, Pang L, Miyasaka T, Saltiel AR y Carter-Su C. (1992) Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3-F442A fibroblasts. *J Biol Chem*; 267: 6074-6080.
- Carpenter G. (1987) receptor for EGF and other polypeptide mitogens. *Ann Rev Biochem*; 56: 881-914.
- Carter-Su C, Schwartz J y Smit LS. (1996) Molecular mechanism of growth hormone action. *Ann Rev Physiol*; 58: 187-207.
- Case RM. (1978) Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. *Biol Rev*; 53: 211-354.

- Case RM y Argent BE. (1989) Pancreatic secretion of electrolites and water. En: Handbook of Physiology. Section 6: The gastrointestinal system. Vol III. Salivary, gastric, pancreatic and hepatobiliary secretion. Ed: Schulz, Forte y Rauner. American Physiological Society, Bethesda, Maryland. pp: 383-417.
- Case RM y Argent BE. (1993) Pancreatic duct cell secretion. Control and mechanism of transport. En: The pancreas: biology, pathobiology and disease. Ed: Go VLW. Raven Press, New York. pp 301-350.
- Chandrasekar B y Kore M. (1991) Basic fibroblast growth factor is a calcium-mobilizing secretagogue in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Com*; 177: 166-170.
- Chang A y Jamieson JD. (1989) Structural and secretory polarity in the pancreatic acinar cell. En: The gastrointestinal system. Vol III. Eds: Schultz SG, Forte JG y Rauner BB. American Physiological Society, Bethesda, Maryland; pp 531-548.
- Chariot J, Roze C y Vaille C. (1979) Effects de la cimétidine sur la sécrétion pancréatique externe chez le rat. *Thérapie*; 34; 367-376.
- Charlesworth A, Broad S y Rozengurt E. (1996) The bombesin / GRP receptor transfected into Rat-1 fibroblasts couples to phospholipase C activation, tyrosine phosphorylation of p125<sup>FAK</sup> and paxillin and cell proliferation. *Oncogene*; 12: 1337-1345.
- Chaudhry A, Conway BR, Laychock SG y Rubin RP. (1989) Analysis of the regulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate synthesis by arachidonic acid in exocrine pancreas. *Arch Biochem Biophys*; 272:488-495.
- Chen H-C y Guan J-L. (1994) Stimulation of phosphatidylinositol 3'-kinase association with focal adhesion kinase by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem*; 269: 31229-31233.
- Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burrige K y Juliano RL. (1994) Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J. Biol Chem*; 269: 26602-26605.
- Cheret AM, Scarpignato C, Lewin MJM y Bertaccini G. (1984) Inhibition of the histamine-stimulated adenylate cyclase activity of guinea pig gastric cells by H2-receptor antagonists cimetidine, oxmetidine and SKF 93479. *Pharmacology*; 28: 268-274.
- Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM y Schwartz MA. (1994) The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell*; 79: 507.

- Christophe JP, Conlon TP y Gardner JD. (1976) Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea pig. Binding of radioiodinated peptide. *J Biol Chem*; 251: 4629-4634.
- Chrzanowska-Wodnicka M y Burridge K. (1994) Tyrosine phosphorylation is involved in reorganization of the actin cytoskeleton in response to serum or LPA stimulation. *J Cell Sci*; 107: 3643-3654.
- Clark EA y Brugge JS. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*; 268: 233-239.
- Cobb BS, Schaller MD, Horng-Leu Z y Parsons JT. (1994) Stable association of p60<sup>src</sup> and p59<sup>fyn</sup> with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125<sup>FAK</sup>. *Mol. Cell. Biol*; 14: 147-155.
- Code CF. (1982) En: Pharmacology of histamine receptors. Eds: Ganellin CR y Parsons ME. Wrigly PSG. Bristol. pp 217-235.
- Cohen P y Cohen PT. (1989) Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem*; 264: 21435-21438.
- Colbran RJ, Schworer CM, Hashimoto Y, Fong Y-L, Rich DP, Smith MK y Soderling TR. (1989) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*; 258:313-325.
- Cooper JA. (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*; 105: 1473-1478.
- Cooper JA y Howell B. (1993) The when and how of Src regulation. *Cell*; 73: 1051-1054.
- Coso OA, Chiariello M, Kalinec G, Kyriakis JM, Woodgett J y Gutkind JS. (1995) Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK(SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signalling pathway. *J Biol Chem*; 270: 5620-5624.
- Coughlin SR, Barr PJ, Cousens LS, Fretto LJ y Williams LT. (1988) Acidic and basic growth factors stimulate tyrosine kinase activity in vivo. *J Biol Chem*; 263: 988-993.
- Cox ME, Ely CM, Catling AD, Weber MJ y Parsons SJ. (1996) Tyrosine kinases are required for catecholamine secretion and mitogen-activated protein kinase activation in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*; 66: 1103-1112.

- Crespo P, Xu N, Simonds WF y Gutkind JS. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature*; 369: 418-420.
- Dabrowski A, Grady T, Logsdon CD y Williams JA. (1996) Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*; 271: 5686-5690.
- Dagorn JC, La Bella A, Lahaie RG y Sarles H. (1984) Modifications in pancreatic enzyme proportions following secretory stimulations. *Digestion*; 29: 152-157.
- Dallas Via L, Stimamiglio M, Scapin M, Cesaro L y Deana R. (1996) Correlation between cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration, protein phosphorylation and platelet secretion. *Cell Calcium*; 20: 431-440.
- Damsky CH y Werb Z. (1992) Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr. Opin. Cell. Biol*; 4: 772-781.
- Dash D, Aepfelbacher M y Siess W. (1995) The association of pp125<sup>FAK</sup>, pp60<sup>Src</sup>, CDC42Hs and Rap1B with the cytoskeleton of aggregated platelets is a reversible process regulated by calcium. *FEBS Letters*; 363: 231-234.
- Davis RJ. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*; 268: 14553-14556.
- Davis S, Lu ML, Lo SH, Lin S, Butler JA, Druker BJ, Roberts TM, An Q y Chen LB. (1991) Presence of an SH2 domain in the actin-binding protein tensin. *Science*; 252: 712-715.
- De Brabander M y cols. (1986) Microtubule dynamics during the cell cycle: the effects of taxol and nocodazole on the microtubule system of Ptk2 cells at different stages of the mitotic cycle. *Int Rev Cytol*; 101: 215-274.
- De Nichilo MO y Yamada KM. (1996) Integrin alpha v beta 5-dependent serine phosphorylation of paxillin in cultured human macrophages adherent to vitronectin. *J Biol Chem*; 271: 11016-11022.
- Debas HT y Grossman MJ. (1973) Pure cholecystokinin: pancreatic protein and bicarbonate response. *Digestion*; 9: 469-481.
- Defilipi P, Retta SF, Olivio C, Palmieri M, Venturino M, Silengo L y Tarone G. (1995) p125<sup>FAK</sup> tyrosine phosphorylation and focal adhesion assembly: Studies with phosphotyrosine phosphatase inhibitors. *Exp Cell Res*; 221: 141-152.



- Defilippi P, Venturino M, Gulino D, Duperray A, Boquet P, Fiorentini C, Volpe G, Palmieri M, Silengo L y Tarone G. (1997) Dissection of pathways implicated in integrin-mediated actin cytoskeleton assembly. *J Biol Chem*; 272: 21726-21734.
- Dehaye J-P, Winand J, Poloczek P y Christophe J. (1984) Characterization of muscarinic cholinergic receptors on rat pancreatic acini by N-[<sup>3</sup>H]methylscopolamine binding. *J Biol Chem*; 259: 294-300.
- Dérjard B, Hibi M, Wu I-H, Barret T, Su B, Deng T, Karin M y Davis R. (1994) JNK1 a protein kinase stimulated by UV high and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*; 76: 1025-1037.
- Dionne CA, Jaye M y Schlessinger J. (1991) Structural diversity and binding of FGF receptors. *Ann NY Acad Sci*; 638:161-166.
- Dockray GJ. (1979) Comparative biochemistry and physiology of gut hormones. *Ann Rev Physiol*; 41: 83-95.
- Dockray GJ. (1987) Physiology of enteric neuropeptides. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Ed: Johnson. Raven Press, New York. pp41-66.
- Dormer RL y Williams JA. (1981) Secretagogue-induced changes in subcellular Ca<sup>2+</sup> distribution in isolated pancreatic acini. *Am J Physiol*; 240: G130-G140.
- Douglas WW. (1968) Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol*; 34:451-474.
- Drenckhahn D, Beckerle MC, burridge K y Otto JJ. (1988) Identification and subcellular location of talin in various cells types and tissues by means of vinculin overlay, immunoblotting and immunocytochemistry. *Eur. J. Cell Biol*; 46: 513-522.
- Duan R-D, Wagner ACC, Yule D y Williams JA. (1994) Multiple inhibitory effects of genistein on stimulus-secretion coupling in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 266: G303-G310.
- Duan R-D y Williams JA. (1994) Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 267: 401-408.
- Duan R-D, Zheng C-F, Guan K-L y Williams JA. (1995) Activation of MAP kinase kinase (MEK) and Ras by cholecystokinin in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 268: 1060-1065.

- Ebert M, Yokoyama M, Friess H, Kobrin MS, Buchler MW y Korc M. (1995) Induction of platelet-derived growth factor A and B chains and over-expression of their receptors in human pancreatic cancer. *Int J Cancer*; 62: 529-535.
- Ederveen AGH, Van Der Leest JVM, Van Emst-De Vries SE, De Pont JJHHM. (1989) Phosphorylation of low molecular mass cytosolic proteins by protein kinase C and protein kinase A in the rabbit exocrine pancreas. *Eur J Biochem*; 185: 461-468.
- Egan SE y Weinberg RA. (1993) The pathway to signal achievement. *Nature*; 365: 781-783.
- Erspamer V, Improta G y Melchiorri P. (1974) Evidence of cholecystokinin in release by bombesin in the dog. *Br. J. Pharmacol.*; 52: 227-232.
- Erspamer V y Melchiorri P. (1973) Active polypeptides of the amphibian skin and their synthetic analogues. *Phys Appl Chem*; 35: 463-494.
- Fantl WJ, Johnson DE y Williams LT. (1993) Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*; 62: 453-481.
- Fathi Z, Corjay MH, Shapira H, Wada E, Benya R, Jensen R, Viallet J, Sausville EA y Battey JF. (1993) BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J Biol Chem*; 268: 5979-5984.
- Fincham VJ, Wyke JA y Frame MC. (1995) V-Src-induced degradation of focal adhesion kinase during morphological transformation of chicken embryo fibroblasts. *Oncogene*; 10: 2247-2252.
- Fischer JB y Schonbrunn A. (1988) The bombesin receptor is coupled to a guanine nucleotide-binding protein which is insensitive to pertussis and cholera toxins. *J Biol Chem*; 263:2808-2816.
- Flinn HM y Ridley AJ. (1996) Rho stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, p130 and paxillin. *J. Cell Sci*; 109: 1133-1141.
- Fourmy D, Zahidi A, Fabre R, Guidet M, Pradayrol L y Ribet A. (1987) Receptors for cholecystokinin and gastrin peptides display specific binding properties and are structurally different in guinea-pig and dog pancreas. *Eur J Biochem*; 165: 683-692.
- Fourmy D, Zahidi A, Pradayrol L, Vayssette J y Ribet A. (1984) Relationship of CCK/gastrin receptor binding to amylase release in dog pancreatic acini. *Regul Pept*; 10: 57-68.

- García LJ, Pradhan TK, Weber HC, Moody TW y Jensen RT. (1997) The gastrin-releasing peptide receptor is differentially coupled to adenylate cyclase and phospholipase C in different tissues. *Biochem Biophys Acta*; 1356: 343-354.
- García LJ, Rosado JA, González A y Jensen RT. (1997) Cholecystokinin-stimulated tyrosine phosphorylation of p125<sup>FAK</sup> and paxillin is mediated by phospholipase C-dependent and -independent mechanisms and requires the integrity of the actin cytoskeleton and participation of p21<sup>rho</sup>. *Biochem J*; 327: 461-472.
- Gardner JD y Jackson MJ. (1977) Regulation of amylase released from dispersed pancreatic acinar cells. *J Physiol*; 270: 439-454.
- Gardner JD y Jensen RT. (1981) Regulation of pancreatic enzyme secretion in vitro. En: *Physiology of the digestive tract*. Ed: Johnson. New York. Raven Press; pp 831-871.
- Gardner JD y Jensen RT. (1993) Receptors for secretagogues on pancreatic acinar cells. En: *The Pancreas: biology, pathobiology and diseases*, 2ª edición. Eds: Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber H y Scheele GA. Raven Press, New York. pp 151-166.
- Gardner JD, Sutliff VE, Walker MD y Jensen RT. (1983) Effects of inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase on actions of cholecystokinin, bombesin, and carbachol on pancreatic acini. *Am J Physiol*; 245:G676-G680.
- Geiger B. (1987) Intermediate filaments: looking for a function. *Nature*; 329: 392-393.
- Geisler N y Weber K. (1988) Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments: identification of three kinase A sites in the aminoterminal head domain. *EMBO J*; 7: 15-20.
- Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Belan PV y Petersen OH. (1996) Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell*; 84: 473-480.
- Gershoni JM. (1994) Introduction and basic set-up for protein transfer. En: *Protein blotting. A practical approach*. Ed: Dunbar BS. Oxford University Press. pp 1-2.
- Girault J-A. (1994) Protein kinases and phosphatases. *Neurotransmissions*; 10: 1-5.
- Glenney JR y Zokas L. (1989) Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell Biol*; 108: 2401-2408.

- Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV y Somlyo AP. (1997) Translocation of rhoA associated with  $Ca^{2+}$  sensitization of smooth muscle. *J Biol Chem*; 272: 10704-10709.
- González A, Camello PJ, Pariente JA y Salido GM. (1997a) Free cytosolic calcium levels modify intracellular pH in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Com*; 230: 652-656.
- González A, Pariente JA, Salido GM y Camello PJ. (1997b) Intracellular pH and calcium signalling in rat pancreatic acinar cells. *Pfugers Arch*; 434: 609-614.
- Gorelick FS, Cohn JA, Freedman SD, Dalahunt NG, Gershoni JM y Jamieson JD. (1983) Calmodulin-stimulated protein kinase activity from rat pancreas. *J Cell Biol*; 97: 1294-1298.
- Gorelick FS y Jamieson JD. (1987) The pancreatic acinar cell: Structure-function relationship. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, Second edition. Ed: Johnson LR. Raven Press, New York, pp 1089-1109.
- Grant SGN, Karl KA, Kiebler MA y Kandel ER. (1995) Focal adhesion kinase in the brain: novel subcellular localization and specific regulation by Fyn tyrosine kinase in mutant mice. *Genes & Development*; 9: 1909-1921.
- Groosman MI. (1977) Physiological effects of gastrointestinal hormones. *Fed Proc*; 36: 1930-1932.
- Guan JL y Shalloway D. (1992) Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature Lond*; 358: 690-692.
- Gutkind JS, Crespo P, Xu N, Teramoto H y Coso OA. (1997) The pathway connecting m2 receptors to the nucleus involves small GTP-binding proteins acting on divergent MAP kinase cascades. *Life Sci*; 60: 999-1006.
- Gutkind JS, Novotny EA, Brann MR y Robbins KC. (1991) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88: 4703-4707.
- Gutkind JS y Robbins KC. (1992) Activation of transforming G protein-coupled receptors induces rapid tyrosine phosphorylation of cellular proteins, including p125FAK and the p130 v-src substrate. *Biochem Biophys Res Commun*; 188: 155-161.

- Haimovich B, Regan C, DiFazio L, Ginalis E, Ji P, Purohit U, Rowley RB, Bolen J y Greco R. The Fc $\gamma$ RII receptor triggers pp125<sup>FAK</sup> phosphorylation in platelets. *J Biol Chem*; 271: 16332-16337.
- Halenda SP y Rubin RP. (1982) Phospholipid turnover in isolated rat pancreatic acini. *Biochem J*; 208: 713-721.
- Hall A. (1990) The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science*; 249: 635-640.
- Hamasaki K, Mimura T, Morino N, Furuya H, Nakamoto T, Aizawa S-I, Morimoto C, Yazaki Y, Hirai H y Nojima Y. (1996) Src kinase plays an essential role in integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate p130<sup>Cas</sup>. *Biochem Biophys Res Commun*; 222: 338-343.
- Hands SK, Calalb MB, Harper MC y Patel SK. (1992) Focal adhesion protein tyrosine kinase phosphorylated in response to cell spreading on fibronectin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; 89: 8487-8489.
- Hanks SK. (1991) Eukaryotic protein kinases. *Curr Opin Struct Biol*; 1: 369-383.
- Hanks SK y Quinn AM. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods enzymol*; 200; 38-62.
- Hanssen LE, Hanssen KF y Myren J. (1977) Inhibition of secretin release and pancreatic bicarbonate secretion by somatostatin infusion in man. *Scand. J. Gastroenterol.*; 12: 391-394.
- Hardie DG. (1991) Cell surface receptors. Signal transduction. En: *Biochemical messengers: hormones, neurotransmitters and growth factors*. Ed. ;hardie DG. Chapman y Hall. London. pp 147-187.
- Hart MJ, Sharma S, elMasry N, Qiu R-G, McCabe P, Polakis P y Bollag G. (1996) Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase. *J. Biol. Chem*; 271: 25452-25458.
- Harte MT, Hildebrand JD, Burnham MR, Bouton AH y Parsons JT. (1996) p130<sup>Cas</sup>, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesion and binds to focal adhesion kinase. *J Biol Chem*; 271: 13649-13655.

- Hartwitz JH, Bokoch GM, Carpenter CL, Janmey PA, Taylor LA, Toker A y Stossel TP. (1995) Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 82, 643-653.
- Hebel R y Stromberg MW. (1976) Digestive system. En: *Anatomy of the laboratory rat*. Eds: Williams y Wilkins. Baltimore. pp 43-52.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A y Karin M. (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *J Biol Chem*; 7: 2135-2148.
- Hildebrand P, Mrozinski JE, Jr, Mantey SA, Patto RJ y Jensen RT. (1993) Pancreatic acini possess endothelin receptors whose internalization is regulated by PLC-activating agents. *Am J Physiol*; 264: 984-993.
- Hildebrand JD, Schaller MD y Parsons JT. (1995) Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein, binds to the carboxy terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell*; 6: 637-647.
- Hill TD, Dean NM y Boynton AL. (1988) Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate induces  $Ca^{2+}$  sequestration in rat liver cells. *Sciences*; 242:1176-1178.
- Hogg N y Landis RC. (1993) Adhesion molecules in cell interactions. *Curr. Opin. Immunol*; 5: 383-390.
- Hokfelt T, Kellerth JO, Ljungdahl A, Nilsson G, Nygard A y Pernow B. (1977) Immunohistochemical localization of substance P in the central and peripheral nervous systems. En: *Neuroregulators and Psychiatric disorders*. Eds: Usdin, Hamburg, Barchas. Oxford: Oxford University Press. pp 299-311.
- Hootman SR, Brown ME, Williams JA y Logsdon CD. (1986) Regulation of muscarinic acetylcholine receptors in cultured guinea pig pancreatic acini. *Am J Physiol*; 251: G75-G83.
- Hootman SR, Picado-Leonard TM y Burnham DB. (1985) Muscarinic acetylcholine receptor structure in acinar cells of mammalian exocrine glands. *J Biol Chem*; 260: 4186-4194.
- Hootman SR y Williams JA. (1987) Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2ª edición. Ed: Johnson. Raven Press. New York. pp 1129-1146.

- Howard JM, Knight M, Jensen RT y Gardner JD. (1984) Discovery of a cholecystokinin analogue with partial agonist activity. *Am J Physiol*; 247: 261-264.
- Huang SC, Yu D-H, Wank SA, Gardner JD y Jensen RT. (1990) Characterization of the bombesin receptor on mouse pancreatic acini by chemical cross-linking. *Peptides*; 11:1143-1150.
- Huang SC, Yu D-H, Wank SA, Mantey S, Gardner JD y Jensen RT. (1989) Importance of sulfation of gastrin or cholecystokinin (CCK) on affinity for gastrin and CCK receptors. *Peptides*; 10: 785-789.
- Huckle WR, Dy RC y Earp HS. (1992) Calcium-dependent increase in tyrosine kinase activity stimulated by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 8837-8841.
- Hwang J, Bragado MJ, Duan RD y Williams, JA. (1996) Protein phosphatase inhibitors potentiate Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rat pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 225: 520-524.
- Hynes RO. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*; 69: 11-25.
- Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T y Aizawa S. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*; 377: 539-544.
- Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K y Nagata S. (1992) Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron*; 8: 811-819.
- Jaken S. (1996) Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol*; 8: 168-173.
- Jena BP, Padfield PJ, Ingebritsen TS y Jamieson JD. (1991) Protein tyrosine phosphatase stimulates Ca<sup>++</sup>-dependent amylase secretion from pancreatic acini. *J Biol Chem*; 266: 17744-17746.
- Jennings LJ, Salido GM, Pariente JA, Davison JS, Singh J y Sharkey KA. (1996) Control of exocrine secretion in the guinea-pig pancreas by histamine H<sub>3</sub> receptors. *Can J Physiol Pharmacol*; 74: 744-752.

- Jensen RT. (1994) Receptors on pancreatic acinar cells. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3ª edición. Ed: Johnson. Raven Press. New York. pp 1377-1446.
- Jensen RT, Charlton CG, Adachi H, Jones SW, O'Donohue y Gardner JD. (1983) Use of <sup>125</sup>I-secretin to identify and characterize high-affinity secretin receptors on pancreatic acini. *Am j Physiol*; 245: 186-195.
- Jensen RT y Coy DH. (1991) Progress in the development of potent bombesin receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci*; 12:13-19.
- Jensen RT y Gardner JD. (1978) Cyclic nucleotide-dependent protein kinase activity in acinar cells from guinea pig pancreas. *Gastroenterology*; 75: 806-817.
- Jensen RT y Gardner JD. (1991) Cholecystokinin receptors antagonists in vitro. En: *Cholecystokinin antagonists in gastroenterology: basic and clinical studies*. Eds: Adler G y Beglinger C. Heidelberg: Springer-Verlag, pp 93-111.
- Jensen RT, Lemp GF y Gardner JD. (1980) Interaction of cholecystokinin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 77: 2079-2083.
- Jensen RT, Lemp GF y Gardner JD. (1982) Interaction of COOH-terminal fragments of cholecystokinin with receptors on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem*; 257: 5554-5559.
- Jensen RT, Tatemoto K, Mutt V, Lemp GF y Gardner JD. (1981) Actions of a newly isolated intestinal peptide PHI on pancreatic acini. *Am J Physiol*; 241: 498-502.
- Jensen RT, Wank SA, Rowley WH, Sato S y Gardner JD. (1989) Interactions of cholecystokinin with pancreatic acinar cells: a well studied model of a peripheral action of CCK. *Trends Pharmacol Sci*; 10: 418-423.
- Johnson CL. (1982) En: *Pharmacology of histamine receptors*. Ed: Ganellin R y Parsons M. Wright y Sons. London, pp 146-216.
- Jones P, Jackson P, Price GJ, Patel B, Ohanion V, Lear AL y Critchley DR. (1989) Identification of a talin binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J. Cell Biol*; 109: 2917-2927.



- Jorpes JE y Mutt V. (1961) The gastrointestinal hormones secretin and cholecystokinin. En: *The exocrine pancreas* Ed: Reuck AVS y Cameron MP. Ciba Found. Symp., Churchill, London. pp 150-164.
- Jorpes JE y Mutt V. (1973) *Handbook of Experimental Physiology. Secretin, cholecystokinin, pancreozymin.* Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg.
- Juliano RL y Haskill S. (1993) Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol*; 120: 577-585.
- Juma LMO, Singh J, Pallot DJ, Salido GM y Adeghate E. Interactions of islet hormones with acetylcholine in the isolated rat pancreas; *Peptides* (en prensa).
- Jungermann J, Lerch MM, Weidenbach H, Lutz MP, Kruger B y Adler G. (1995) Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation. *Am J Physiol*; 268: 328-338.
- Kanner SB, Reynolds AB, Vines RR y Parsons JT. (1990) Monoclonal antibodies to tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; 87: 3328-3332.
- Kanno T y Saito A. (1976) The potentiating influences of insulin on pancreozymin-induced hyperpolarization and amylase release in the pancreatic acinar cell. *J. Physiol.*; 261: 505-521.
- Kapoor CL y Krishna G. (1978) A possible role for guanosine 3', 5'- monophosphate in the stimulus-secretion coupling in exocrine pancreas. *Biochim Biophys Acta*; 544:102-112.
- Katagiri K y Matsuura S. (1971) Antitumor activity of cytochalasin D. *J Antibiot (Tokyo)* 24: 722-723.
- Kern HF. (1986) Fine structure of the human exocrine pancreas. En: *The exocrine pancreas: biology, pathobiology and diseases.* Ed: Go VLW. Raven Press, New York. pp 9-19.
- Kharbanda S, Saleem A, Yuan Z, Emoto Y, Prasad KVS y Kufe D. (1995). Stimulation of human monocytes with macrophage colony-stimulating factor induces a Grb2-mediated association of the focal adhesion kinase pp125<sup>FAK</sup> and dynamin. *Proc Natl Acad Sci*; 92: 6132-6136.

- Kinoshita FA, Ueno Y, Miwa M, Nishino M e Inoue H. (1996) Protein tyrosine kinase inhibitors promote amylase secretion and inhibit ornithine decarboxylase induction in sialagogue-stimulated rat parotid explants. *Biochem Biophys Res Commun*; 223: 170-174.
- Klee CB, Ni W-C, Draetta GF y Newton, DL. (1986) Different modes of interaction of calmodulin with its target enzymes. *J Cardiovasc Pharmacol*; 8: 52-56.
- Klueppelberg UG, Gates LK, Gorelick FS y Miller LJ. (1991) Agonist-regulated phosphorylation of the pancreatic cholecystokinin receptor. *J Biol Chem*; 266:2403-2408.
- Knight JB, Yamauchi K y Pressin JE. (1995) Divergent insulin and platelet-derived growth factor regulation of focal adhesion kinase (pp125<sup>FAK</sup>) tyrosine phosphorylation, and rearrangement of actin stress fibers. *J Biol Chem*; 270: 10199-10230.
- Kojima I, Lippes H, Kojima K y Rasmussen H. (1983) Aldosterone secretion: effect of phorbol ester and A23187. *Biochem Biophys Res Commun*; 116: 555-562.
- Kolega J. (1986) Effects of mechanical tension on protrusive activity and microfilament and intermediate filament organization in an epidermal epithelium moving in culture. *J Cell Biol*; 102: 1400-1411.
- Konrad RJ, Dean RM, Young RA, Billings PC y Wolf BA. (1996) Glucose-induced tyrosine phosphorylation of p125 in beta cells and pancreatic islets. *J Biol Chem*; 271: 24179-24186.
- Konturek SJ, Bilski J, Tasler J y Laskiewicz J. (1985) Gut hormones in stimulation of gastroduodenal alkaline secretion in conscious dogs. *Am J Physiol*; 248: G687-G691.
- Korc M, Matrisian LM, Planck SR y Magun BE. (1983) Binding of epidermal growth factor in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun*; 111: 1066-1073.
- Korman LY, Walker MD y Gardner JD. (1980) Action of theophylline on secretagogue-stimulated amylase release from dispersed pancreatic acini. *Am J Physiol*; 239: 324-333.
- Korn ED. (1982) Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol Rev*; 62: 672-737.
- Koyama Y y Baba A. (1994) Endothelins are extracellular signals modulating cytoskeletal actin organization in rat cultured astrocytes. *Neuroscience*; 61: 1007-1016.

- Koyama Y y Baba A. (1996) Endothelin-induced cytoskeletal actin re-organization in cultured astrocytes: inhibition by C3 ADP-ribosyltransferase. *Glia*; 16: 342-350.
- Kreis TE y Birchmeier W. (1980) Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell* 22: 555-561.
- Krims PE y Pandol SJ. (1988) Free cytosolic calcium and secretagogue-stimulated initial pancreatic exocrine secretion. *Pancreas*; 3: 383-390.
- Kumagai N, Morii N, Fujisawa K, Yoshimasa T, Nakao K y Narumiya S. (1993) Lysophosphatidic acid induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP-kinase and focal adhesion kinase in cultured Swiss 3T3 cells. *FEBS*; 329 (3): 273-276.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie E, Ahmad M, Avruch J y Woodgett J. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*; 369: 156-160.
- Lach EB, Broad S y Rozengurt E. (1995) Mitogenic signaling by transfected neuromedin B receptors in Rat-1 cells. *Cell Growth Differ*; 6: 1427-1435.
- Lackie JM. (1986) Cell movement and cell behaviour. Eds: Allen and Urwin. London; pp 253-275.
- Lajas AI, Pariente JA y Salido GM. (1995) Histamine and the cAMP pathway in the guinea-pig pancreas. *Cellular Signalling*; 7: 57-60.
- Lajas AI, Pozo MJ, Pariente JA y Salido GM. (1997) Basic fibroblast growth factor (bFGF) inhibit CCK8-induced amylase release in isolated rat pancreatic acini. *J Physiol Biochem*; 53: 89.
- Lajas AI, Pozo MJ, Salido GM, Singh J y Pariente JA. (1996) Secretory activity and trophic effects of epidermal growth factor in the rat pancreas. *Arch Physiol Biochem*; 104: 293-299.
- Lambert M, Bui ND y Christophe J. (1991) Functional and molecular characterization of CCK receptors in the rat pancreatic acinar cell line AR 42J. *Regul Pept*; 32: 151-167.
- Lankisch PG. (1980) Trophic effects of gastrointestinal hormones. *Clinics Gastroenterol*; 9: 773.
- Larose L, Dumont Y, Asselin J, Morisset J y Poirier GG. (1981) Muscarinic receptor on rat pancreatic acini: [<sup>3</sup>H]QNB binding and amylase secretion. *Eur J Pharmacol*; 76:247-254.

- Leavesley DI, Schwartz MA, Rosenfeld M y Cheresch DA. (1993) Integrin beta 1-and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signalling mechanisms. *Cell Biol*; 121: 163-170.
- Lee PC. (1979) Effect of CCK-octapeptide and secretin on amylase secretion in isolated rat pancreatic acinar cells. *Digestion*; 19: 6-14.
- Lee K-M y Villereal ML. (1996) Tyrosine phosphorylation and activation of pp60<sup>c-src</sup> and pp125<sup>FAK</sup> in bradykinin-stimulated fibroblasts. *Am J Physiol*; 270: 9945-9948.
- Leeb-Lundberg LMF y Song XH. (1991) Bradykinin and bombesin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of a 120-KDa group of proteins in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*; 266: 7746-7749.
- Leeb-Lundberg LMF, Song XH y Mathis SA. (1994) Focal adhesion-associated proteins p125<sup>FAK</sup> and paxillin are substrates for bradykinin-stimulated tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*; 269: 24328-24334.
- Leeman SE y Hammerchlag R. (1967) Stimulation of salivary secretion by a factor extracted from hypothalamic tissue. *Endocrinology*; 81: 803-810.
- Leung T, Chen XQ, Manser E y Lim L. (1996) The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol*; 16: 5313-5327.
- Leung T, Manser E, Tan L y Lim L. (1995) A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related Rho A GTPase which translocates the kinase to peripheral. *J Biol Chem*; 270: 29051-29054.
- Lewin MJM, Bado A, Cherifi Y y Reyl-desmars F. (1992) The gastric H<sub>3</sub>-receptor: A review. *Yale J Biol Med*; 65: 607-611.
- Li Y y Owyang C. (1992) Somatostatin inhibits pancreatic enzyme secretion by a central vagal site of action. *Gastroenterology*; 102: A276.
- Liddle RA. (1994) En: Gut peptides. Eds: Walsh JH y Dockray GJ. Raven Press, New York. pp 175-216.
- Liebow C y Franklin JE. (1982) Histamine stimulation of digestive enzyme secretion by in vitro rabbit pancreas. *Dig Dis Sci*; 27: 234-241.

- Lin J-T, Mantey SA, Coy DH y Jensen RT. (1992) Peptide structural determinants for selectivity for subtypes of bombesin receptors. *Gastroenterology*; 102:A753.
- Liu X, Brodeur SR, Gish G, Zhou S, Cantley LC, Laudano AP y Pawson T. (1993) Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain. *Oncogene*; 8: 1119-1126.
- Loffelholz K. (1989) Receptor regulation of choline phospholipid hydrolysis. *Biochem Pharmacol*; 38: 1543-1549.
- Logsdon CD y Williams JA. (1983) Epidermal growth factor binding and biologic effects on mouse pancreatic acini. *Gastroenterology*; 85:339-345.
- Logsdon CD y Williams JA. (1984) Intracellular Ca<sup>2+</sup> and phorbol esters synergistically inhibit internalization of epidermal growth factor in pancreatic acini. *Biochem J*; 223: 893-900.
- Louie DS y Owyang C. (1991) Carbachol acts through protein kinase C to modulate cholecystokinin receptors in pancreatic acini. *Am J Physiol*; 261:G981-G986.
- Lu L y Logsdon CD. (1992) CCK, bombesin, and carbachol stimulate *c-fos*, *c-jun*, and *c-myc* oncogene expression in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 263: 327-332.
- Luna EJ y Hitt AL. (1992) Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science*; 258: 955.
- Lutz MP, Sutor SL, Abraham RT y Miller LJ. (1993) A role for cholecystokinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation in regulated secretion by the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem*; 268: 11119-11124.
- Lyman S, Gilmore A, Burridge K, Gidwitz S y White II GC. (1997) Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is independent of focal adhesion formation or integrin activation. *J Biol Chem*; 272: 22538-22547.
- Maher PA y Pasquale EB. (1988) Tyrosine phosphorylated proteins in different tissues during chick embryo development. *J. Cell Biol*; 106: 1747-1755.
- Malarkey K, Belham CM, Paul A, Graham A, McLees A, Scott PH y Plevin R. (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem J*; 309: 361-375.
- Malawista SE y De Biosfleury Chevance A. (1982) The cytokinetoplast: purified, stable, and functional motile machinery from human blood polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol*; 95: 960-973.

- Mangos JA, McSherry NR, Nousia-Arvanitakis S y Irwin K. (1973) Secretion and transductal fluxes of ions in exocrine glands of the mouse. *Am J Physiol*; 225: 18-24.
- Mantey SA, Weber HC, Sainz E, Akeson M, Ryan RR, Pradham TK, Searles RP, Spindel ER, Battey JF, Coy DH, Jensen RT. (1997) Discovery of a high affinity radioligand for the human orphan receptor, bombesin receptor subtype 3, which demonstrates that it has a unique pharmacology compared with other mammalian bombesin receptors.
- Mariot P, O'Sullivan AJ, Brown AM y Tatham PER. (1996) Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor protein (RhoGDI) inhibit exocytosis in mast cells. *EMBO J*; 15: 6476-6482.
- Marx M, Gómez G, Lonovics J y Thompson JC. (1987) Cholecystokinin. En: *Gastrointestinal endocrinology*. Eds: Thompson JC, Greeley GH, Rayford PL, Towersend CM. Mc Graw-Hill, pp 213-222.
- Matozaki T, Goke B, Tsunoda Y, Rodriguez M, Martinez J y Williams JA. (1990) Two functionally distinct cholecystokinin receptors show different modes of action on  $Ca^{2+}$  mobilization and phospholipid hydrolysis in isolated rat pancreatic acini. *J Biol Chem*; 265: 6247-6254.
- Matozaki T y Williams JA. (1989) Multiple sources of 1,2-diacylglycerol in isolated rat pancreatic acini stimulated by cholecystokinin. *J Biol Chem*; 264: 14729-14734.
- Matozaki T, Zhu W-Y, Tsunoda Y, Goke B y Williams JA. (1991) Intracelllular mediators of bombesin action on rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 260:G858-G864.
- Matsumoto T y Kanno T. (1984) Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by either electrical stimulation of the vagus nerve or exogenous VIP administration in the guinea pig pancreas. *Peptides*; 5: 285-289.
- May RJ, Conlon TP, Erspamer V y Gardner JD. (1978) Actions of peptides isolated from amphibian skin on pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 235: 112-118.
- Mayer BJ, Ren R, Clarck KL y Baltimore D. (1993) A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell*; 73: 629-630.
- Mcnamee HM, Ingber DE y Schwartz MA. (1992) Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. *J Cell Biol*; 121: 673-678.

- Meldrum E, Parker PJ y Carozzi A. (1991) The PtdIns-PLC superfamily and signal transduction. *Biochim Biophys Acta*; 1092: 49-71.
- Milam LM. (1985) Electron microscopy of rotary shadowed vinculin and vinculin complexes. *J. Mol. Biol*; 184: 543-545.
- Mizuhira V, Nakamura H, Yotsomoto H y Namea T. (1972) An application of the electron probe x-ray microanalyser distribution in the gastric mucosal epithelium. *Proc. IVth International Congress of Histochemistry and Cytochemistry*, pp 275-276.
- Muallen S. (1989) Calcium transport pathways of pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol*; 51:83-105.
- Muallen S, Kwiatkowska K, Xu X y Yin HL. (1995) Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol*; 128: 589-598.
- Murakami M, Vinayek R, Jensen RT y Gardner JD. (1989) Carbachol-induced down regulation of high affinity receptors for vasoactive intestinal peptide. *Am J Physiol*;257: G402-G408.
- Murillo A y López MA. (1971) Contribución al estudio de la regulación hormonal de la secreción pancreática en el conejo. *Rev Esp Fisiol*; 27: 131-138.
- Nagalla Sr, Barry BJ, Creswick KC, Eden P, Taylor JT y Spindel ER. (1995) Cloning of a receptor for amphibian [Phe<sup>13</sup>]bombesin distinct from the receptor for gastrin-releasing peptide: identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB4). *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 6205-6209.
- Nairn AC, Bhagat B y Palfrey HC. (1985) Identification of calmodulin-dependent protein kinase III and its major M<sub>r</sub> 100.000 substrate in mammalian tissues. *Proc Natl Acad USA*; 82: 7939-7943.
- Nairn AC y Palfrey HC. (1987) Identification of the major M<sub>r</sub> 100.000 substrate for calmodulin dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J Biol Chem*; 262: 17299-17303.
- Nigam SK y Blobel G. (1989) Cyclic AMP-dependent protein kinase in canine pancreatic rough endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*; 264: 16927-16932.
- Nishizuka Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*; 308: 693-697.

- Norman JC, Price LS, Ridley AJ y Koffer A. (1996) The small GTP-binding proteins, Rac and Rho, regulate cytoskeletal organization and exocytosis in mast cells by parallel pathways. *Mol Biol of the Cell*; 7: 1429-1442.
- Ogami Y, Kimura T, Arita Y y Nawata H. (1989) The relationship between free cytosolic calcium and amylase release in rat pancreatic acini. *Jpn J Physiol*; 39: 571-584.
- Ohnishi H, Ernst SA, Wys N, McNiven M y Williams JA. (1996) Rab3D localizes to zymogen granules in rat pancreatic acini and other exocrine glands. *Am J. Physiol*; 271: 531-538.
- Okabayashi Y, Otsuki M, Nakamura T, Koide M, Hasegawa H, Okutani T y Kido Y. (1990) Regulatory effect of cholecystokinin on subsequent insulin binding to pancreatic acini. *Am J Physiol*; 258: 562-568.
- O'Konski MS y Pandol SJ. (1990) Effects of caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell. *J Clin Invest*; 86: 1649-1657.
- O'Konski MS y Pandol SJ. (1993) Cholecystokinin JMV-180 and caerulein effects on pancreatic acinar cell cytoskeleton. *Pancreas*; 8: 638-646.
- Olmsted JB. (1986) Microtubule-associated proteins. *Annu Rev Cell Biol*; 2: 421-457.
- Olson MF, Ashworth A y Hall A. (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc 42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*; 269: 1270-1272.
- Osborn M y Weber K. (1983) Tumor diagnosis by intermediate filaments typin: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest*; 48: 372-394.
- Otey CA. (1996) pp125<sup>FAK</sup> in the focal adhesion. *Int Rev of Cyt*; 167: 161-183.
- Otey CA, Pavalko FM y Burridge K. (1990) An interaction between  $\alpha$ -actin and the  $\beta$ 1 integrin subunit in vitro. *J. Cell Biol*; 111: 721-729.
- Owens LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kronberg L, Liu ET y Cance WG. (1995) Overexpression of the focal adhesion kinase (p125<sup>FAK</sup>) in invasive human tumors. *Cancer Res*; 55: 2752-2755.
- Pandol SJ y Schoeffield-Payne MS. (1986) 1,2 diacylglycerol, protein kinase C and pancreatic enzyme secretion. *J Biol Chem*; 261: 4438-4444.



- Pandol SJ y Schoeffield-Payne MS. (1990) Cyclic GMP mediates the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem*; 265: 12846-12853.
- Pariante JA, Francis LP, Salido GM y Madrid JA. (1990) Cimetidine increases the pancreatic response to histamine. *Agents Actions*; 30: 307-312.
- Pariante JA, Madrid JA y Salido GM. (1989) Histamine receptors in unstimulated exocrine secretion of the rabbit. *Agents Actions*; 28: 62-69.
- Pariante JA, Singh J, Salido GM, Jennings L y Davison JS. (1991) Activación de histamine receptors is associated with amylase secretion and calcium mobilization in guinea-pig pancreatic acinar cells. *Cell Physiol Biochem*; 1: 111-120.
- Parsons JT, Schaller MD, Hildebrand J, Leu T-H, Richardson A y Otey C. (1994) Focal adhesion kinase: structure and signalling. *J. Cell Sci*; 18: 109-113.
- Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K y Hall A. (1990) Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol*; 111: 1001-1007.
- Pawson T y Gish GD. (1992) SH2 y SH3 domains: from structure to function. *Cell*; 71: 359-362.
- Peikin SR, Rottman AJ, Batzri S y Gardner JD. (1978) Kinetics of amylase release by dispersed acini prepared from guinea pig pancreas. *Am J Physiol*; 235: E743-E749.
- Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Ramachandran J y Capon DJ. (1988) Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature*; 334:434-437.
- Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J y Capon DJ. (1987) Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J*; 6: 3923-3929.
- Petersen CCH, Toescu EC y Petersen OH. (1991) Different patterns of receptor-activated cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations in single pancreatic acinar cells: dependence of receptor type, agonist concentration and intracellular Ca<sup>2+</sup> buffering. *EMBO J*; 10(3):527-533.

- Piiper A, Stryjek-Kaminska D, Stein J, Caspary WF y Zeuzem S. (1994) Tyrphostins inhibit secretagogue-induced 1,4,5-IP<sub>3</sub> production and amylase release in pancreatic acini. *Am J Physiol*; 266: G363-G371.
- Piiper A, Stryjek-Kaminska D y Zeuzem S. (1997) Epidermal growth factor activates phospholipase C- $\gamma$ 1 vía G<sub>i</sub>1-2 proteins in isolated pancreatic acinar membranes. *Am J Physiol*; 272: 1276-1284.
- Pillay TS, Sasaoka T y Olefsky JM. (1995) Insulin stimulates the tyrosine dephosphorylation of pp125 focal adhesion kinase. *J Biol Chem*; 270: 991-994.
- Podolsky DK. (1994). Peptide growth factors in the gastrointestinal tract. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3ª edición. Ed: Johnson. Raven Press. New York. pp 129-168.
- Poirier J. (1985) Histología del páncreas exocrino. En: *Cuadernos de histología*. Ed; Marbán y Librería Médica . pp 341-345.
- Pollo DA, Baldassare JJ, Honda T, Henderson PA, Talkad VD y Gardner JD. (1994) Effects of cholecystokinin (CCK) and other secretagogues on isoforms of protein kinase C (PKC) in pancreatic acini. *Biochim Biophys Acta*; 1224: 127-138.
- Polte TR y Hanks SK. (1995) Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 10678-10682.
- Polte TR, Jaftilan AJ y Hanks SK. (1994) Focal adhesion kinase is abundant in developing blood vessels and elevation of its phosphotyrosine content in vascular smooth muscle cells is a rapid response to angiotensin II. *J Cell Biochem*; 55: 106-119.
- Pozo MJ, Salido GM y Madrid JA. (1990) Action of cholecystokinin on the dog sphincter of Oddi: influence of anti-cholinergic agents. *Arch Int Physiol Biochim*; 98: 353-360.
- Price LS, Norman JC, Ridley AJ y Koffer A. (1995) The small GTPases Rac and Rho as regulators of secretion in mast cells. *Curr Biol*; 5: 68-73.
- Profrock A, Piiper A, Eckhardt L y Schulz I. (1991) Epidermal growth factor inhibits both cholecystokinin octapeptide-induced inositol 1,4,5-trisphosphate production and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase in rat pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 180: 900-906.

- Profrock A, Zimmermann P y Schulz I. (1992) Bombesin receptors interact with Gi and p21<sup>ras</sup> proteins in plasma membranes from rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 263:G240-G247.
- Pulverer BJ, Kyriakos JM, Avruch J, Nikolakaki E y Woodgett JR. (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*; 353: 670-674.
- Purushotham KR y Humphreys-Beher MG. (1995) The role of phosphotyrosine signaling pathway in parotid gland proliferation and function. *Crit Rev Oral Biol Med*; 6: 119-131.
- Putney JW Jr. (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*; 11: 611-624.
- Rankin S, Morii N, Narumiya S y Rozengurt E. (1994) Botulinum C3 exoenzyme blocks the tyrosine phosphorylation of p125<sup>FAK</sup> and paxillin induced by bombesin and endothelin. *FEBS Letters*; 354: 315-319.
- Rankin S y Rozengurt E. (1994) Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125<sup>FAK</sup>) and paxillin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Bell-shaped dose response and cross-talk with bombesin. *J. Biol. Chem*; 269: 704-710.
- Raufman J-P, Malhotra R y Singh L. (1991) PACAP-38, a novel peptide from ovine hypothalamus, is a potent modulator of amylase release from dispersed acini from rat pancreas. *Reg Pep*; 36: 121-129.
- Receptor Nomenclature Supplement. (1991) *Trends Pharmacol Sci*: 1-43.
- Reed PW y Lardy HA. (1972) A23187: a divalent cation ionophore. *J Biol Chem*; 247: 6970-6977.
- Reichlin S. (1983) Somatostatin. *N. Engl. J. Med.*; 309: 1495-1501.
- Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P y Baltimore D. (1993) Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science*; 259: 1157-1161.
- Renshaw MW, Toksoz D y Schwartz MA. (1996) Involvement of the small GTPase rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*; 271: 21691-21694.
- Rhee SG, Kim H, Suh P-G, Choi WC. (1991) Multiple forms of phosphoinositide-specific phospholipase C and different modes of activation. *Biochem Soc Trans*; 19: 337-341.

- Ribet A, Vaysse N y Clemente F. (1985) Fisiología del páncreas exocrino. En: Fisiología humana. Ed: Meyer. Salvat, Barcelona. pp 273-308.
- Ridley AJ. (1994) Signal transduction through the GTP-binding proteins Rac and Rho. *J Cell Sci*; 18: 127-131.
- Ridley AJ. (1995) Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Genet Dev*; 5: 24-30.
- Ridley AJ y Hall A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*; 70: 389-399.
- Rivard N, Rydzewska G, Lods J-S, Martinez J y Morisset J. (1994) Pancreas growth tyrosine kinase, PtdIns 3-kinase, and PLD involve high-affinity CCK-receptor occupation. *Am J Physiol*; 266: G62-70.
- Rivard N, Rydzewska G, Lods J-S y Morisset J. (1995) Novel model of integration of signaling pathways in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 269: G352-362.
- Robberecht P, Conlon TP y Gardner JD. (1976) Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed acinar cells from the guinea pig: structural requirements for effects of VIP and secretin on cellular cyclic AMP. *J Biol Chem*; 251: 4635-4639.
- Robberecht P, Deschodt-Lanckman M, Morgat JL y Christophe J. (1978) The interaction of caerulein with rat pancreas. Structural requirements for *in vitro* binding of caerulein-like peptides and its relationship to increased calcium outflux, adenylate cyclase activation and secretion. *Eur J Biochem*; 91: 39-48.
- Rosado JA, García LJ y Salido GM. (1997a) Ionic requirements in histamine-evoked potassium efflux in guinea pig pancreas. *Revista Española de Fisiología*; 53: 231-238.
- Rosado JA, Singh J, Salido GM y García LJ. (1997b) Acetylcholine-evoked potassium transport in the isolated guinea-pig pancreas. *Exp Physiol*; 82: 149-159.
- Rosado JA, Tapia JA, García LJ y Salido GM (1996) Histamine-evoked potassium release in the mouse and guinea pig pancreas. *Pancreas*; 12: 396-400.
- Rowley WH, Sato S, Huang SC, Collado-Escobar DM, Beaven MA, Wang LH, Martínez J, Gardner JD y Jensen RT. (1990) Cholecystokinin-induced formation of inositol phosphates in pancreatic acini. *Am J Physiol*; 259:G655-G665.

- Rozengurt E. (1986) Early signals in the mitogenic response. *Science*; 234: 161-166.
- Rozengurt E. (1995) Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surveys*. Vol 24: Cell Adhesion and Cancer: 81-96.
- Rubin RP, Godfrey PP, Chapman DA y Putney JW, Jr. (1984) Secretagogue-induced formation of inositol phosphates in rat exocrine pancreas. *Biochem J*: 219: 655-659.
- Ruoslahti E y Reed JC. (1994) Anchorage-dependence, integrins, and apoptosis. *Cell*; 77: 477-478.
- Rutten WJ, De Pont JJHM y Bonting SL. (1972) Adenylate cyclase in the rat pancreas properties and stimulation by hormones. *Biochim Biophys Acta*; 274: 201-213.
- Sadler I, Crawford AW, Michelson JW y Beckerele MC. (1992) Zxin and cCRP: two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. *J. Cell Biol*; 119:1573-1588.
- Sah VP, Hoshijima M, Chien KR y Brown JH. (1996) Rho is required for Gq and 1-adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes Dissociation of Ras and Rho pathways. *J Biol Chem*; 271: 31185-31190.
- Saito A, Williams JA y Kanno T. (1980) Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by both exogenous and endogenous insulin in isolated and perfused rat pancreata. *J Clin Invest*; 65: 777-782.
- Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Mano H, Yazaki Y y Hirai H. (1994) A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J*; 13: 3748-3756.
- Salido GM, Lennard R, Singh J y Pariente JA. (1990) Histamine-evoked amylase secretion is associated with small changes in calcium mobilization in isolated guinea-pig pancreas. *Exp Physiol*; 75: 263-266.
- Salido GM, Pariente JA, Jennings L, Sarkey KA, Davison JS y Singh J. (1997) Effects of histamine H<sub>3</sub> receptors on nerve-mediated protein secretion and <sup>3</sup>H-choline release in the isolated guinea-pig pancreas. *Biogenic amines*; 13: 425-439.
- Salido GM, Raggi L y Madrid JA. (1986) Efectos de la secretina y colecistokinina-pancreozimina exógenas sobre la secreción pancreática exocrina en el pollo. *Avances en Ciencias Veterinarias*; 1: 35-40.

- Salmon ED, McKeel M y Hays T. (1984) Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle *in vivo* measured by blocking polymerization with colchicine. *J Cell Biol*; 99: 1066-1075.
- Saluja AK, Dawra RK, Lerch MM y Steer ML. (1992) CCK-JMV-180, an analog of cholecystokinin, releases intracellular calcium from an inositol trisphosphate-independent pool in rat pancreatic acini. *J Biol Chem*; 267: 11202-11207.
- Sandoval J. (1975) Órganos metaperitoneales. Duodeno, páncreas y bazo. Configuración y dependencias. Riego sanguíneo, linfáticos e inervación. Estudio comparativo. En *Anatomía veterinaria*. Volumen II. Ed: Sandoval. Imprenta moderna Córdoba. pp 115-120.
- Sankaran H, Goldfine ID, Deveney CW, Wong K-Y, Williams JA. (1980) Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *J Biol Chem*; 255: 1849-1853.
- Sankaran H, Iwamoto Y, Korc M, Williams JA y Goldfine ID. (1981) Insulin action in pancreatic acini from streptozotocin-treated rats II. Binding of <sup>125</sup>I-insulin to receptors. *Am J Physiol*; 240: 63-68.
- Sasaki H, Nagura K, Ishino M, Tobioka H, Kotani K y Sasaki T. (1995) Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *J Biol Chem*; 270: 21206-21219.
- Sastry SK y Horwitz AF. (1993) Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr. Opin. Cell Biol*; 5: 819-831.
- Sato S, Stark HA, Martínez J, Beaven MA, Jensen RT y Gardner JD. (1989) Receptor occupation, calcium mobilization, and amylase release in pancreatic acini: effect of CCK-JMV-180. *Am J. Physiol*; 257: 202-209.
- Saville MK, Graham A, Malarkey K, Paterson A, Gould GW y Plevin R. (1994) Regulation of endothelin-1-and lysophosphatidic acid-stimulated tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase(pp125fak) in Rat-1 fibroblasts. *Biochem J*; 301: 407-414.
- Schaller MD. (1996) The focal adhesion kinase. *J Endocrinol*; 150: 1-7.

- Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB y Parsons JT. (1992) pp125<sup>FAK</sup>, a structurally unique protein tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 5192-5196.
- Schaller MD, Borgman CA y Parsons JT. (1993) Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125<sup>FAK</sup>. *Mol. Cell. Biol*; 13: 785-791.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR y Parsons JT. (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125<sup>FAK</sup>, directs SH2-dependent binding of p60<sup>src</sup>. *Mol. Cell. Biol*; 14: 1680-1688.
- Schaller MD y Parsons JT. (1995) pp125<sup>FAK</sup>-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol*; 15: 2635-2645.
- Schlessinger J y Ullrich A. (1992) Growth factor signalling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*; 9: 383-391.
- Schlicker E, Betz R y Gother M. (1988) Histamine H3 receptor mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 337: 588-590.
- Schroeder TE. (1973) Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. *Proc Natl Acad Sci USA*; 70: 1688-1692.
- Schulz I (1981) Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Ed: Johnson LR. Raven Press, New York. pp 795-819.
- Schulz I. (1987) Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas. En: *Physiology of the gastrointestinal tract, second edition*. Ed: Johnson LR. Raven Press, New York. pp 1147-1171.
- Schwartz MA. (1992) Transmembrane signaling by integrins. *Trends Cell Biol*; 2: 304-308.
- Sekine A, Fujiwara M y Narumiya S. (1989) Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ASP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*; 264: 8602-8605.
- Seufferlein T, Dominic JW, Broad S, Herget T, Walsh JH y Rozengurt E. (1995) The human CCK<sub>B</sub>/gastrin receptor transfected into Rat1 fibroblasts mediates activation of MAP kinase, p74<sup>raf-1</sup> kinase, and mitogenesis. *Cell Growth Differ*; 6: 383-393.

- Seufferlein T y Rozengurt E. (1994) Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130. *J Biol Chem*; 269: 9345-9351.
- Seufferlein T, Withers DJ, Mann D y Rozengurt E. (1996) Dissociation of mitogen-activated protein kinase activation from p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells stimulated by bombesin, lysophosphatidic acid, and platelet-derived growth factor. *Mol Biol Cell*; 7: 1865-1875.
- Sewell WA y Young JA. (1975) Secretion of electrolytes by the pancreas of the anaesthetized rat. *J Physiol*; 252: 379-396.
- Shattil SJ, Haimovich B, Cunningham M, Lipfert L, Parsons JT, Ginsberg MH y Brugge JS. (1994) Tyrosine phosphorylation of pp125<sup>FAK</sup> in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. *J Biol Chem*; 269: 14738-14745.
- Simon MI, Strathmann MP y Gautam N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*; 252:802-808.
- Singh J. (1985) Mechanism of action of insulin on acetylcholine-evoked amylase secretion in the mouse pancreas. *J. Physiol.*; 358: 469-482.
- Singh J, Asada I, Owlia A, Collins TJ y Thompson JC. (1988) Somatostatin inhibits VIP-stimulated amylase release from perfused guinea pig pancreatic acini. *Am. J. Physiol.*; 254: G217-G223.
- Singh J, Pariente JA y Salido GM. (1997) The physiological role of histamine in the exocrine pancreas. *Inflamm Res*; 46: 159-165.
- Sinnett-Smith J, Zachary I, Valverde AM y Rozengurt E. (1993) Bombesin stimulation of p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation. Role of protein kinase C, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*; 268: 14261-14268.
- Solomon TE. (1994) Control of Exocrine pancreatic secretion. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3<sup>a</sup> edición. Ed: Johnson. Raven Press. New York. pp 1499-1530.
- Somogyi L, Lasic Z, Vukievic S y Banfic H. (1994) Collagen type IV stimulates an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> in pancreatic acinar cells via activation of phospholipase C. *Biochem. J*; 299: 603-611.



- Spicer SS, Sens MA y Tashiam RE. (1982) Immunocytochemical demonstration of carbonic anhydrase in human epithelial cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; 30: 864-873.
- Stark HA, Sharp CM, Sutliff VE, Martínez J, Jensen RT y Gardner JD. (1989) CCK-JMV-180: a peptide that distinguishes high-affinity cholecystokinin receptors from low-affinity cholecystokinin receptors. *Biochim Biophys Acta*; 1010: 145-150.
- Stenson WF y Lobos E. (1982) Metabolism of arachidonic acid by pancreatic acini: relation to amylase secretion. *Am J Physiol*; 242: G493-G497.
- Stephens EV, Kalinec G, Brann MR y Gutkind JS. (1993) Transforming G proteins-coupled receptors transduce potent mitogenic signals in NIH 3T3 cells independent on cAMP inhibition or conventional protein kinase C. *Oncogene*; 8: 19-26.
- Stuenkel EL, Tsunoda Y y Williams JA. (1989) Secretagogue induced calcium mobilization in single pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 158:863-869.
- Sung CK, Hootman SR, Stuenkel EL, Kuroiwa C y Williams JA. (1988) Downregulation of protein kinase C in guinea pig pancreatic acini: effects on secretion. *Am J Physiol*; 254: G242-G248.
- Susini C, Estival A, Scemama JL, Ruellen C, Vaysse N, Clemente F, Esteve JP, Fourmy D y Ribet A. (1986) Studies on human pancreatic acini: action of secretagogues on amylase release and cellular cyclic AMP accumulation. *Pancreas*;1:124-129.
- Susumu, T. (1977) The Pancreas. En: *Histology*. Eds: Weiss L y Greep RO. McGraw Hill Company. pp 747-764.
- Symons M. (1996) Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem Sci*; 21: 178-181.
- Symons M. (1997) Rho family GTPases. *Insights*; 3: 3-5.
- Symons M, Derry JM, Karlak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick F, Francke U y Abo A. (1996) Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723-734.
- Tachinaba K, Sato T, D'Avirro N y Morimoto C. (1995) Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J Exp Med*; 182: 1089-1099.

- Takai Y, Sasaki T, Tanaka K y Nakanishi H. (1995) Rho as a regulator of the cytoskeleton. *TIBS*. June.
- Tallett A, Chilvers ER, MacKinnon AC, Haslett C y Sethi T. (1996) Neuropeptides stimulate tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity in small cell lung cancer cell lines. *Peptides*; 17: 665-673.
- Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Murakami H, Nakamura I, Kurokawa T y Suda T. (1995) Possible involvement of focal adhesion kinase, p125<sup>FAK</sup>, in osteoclastic bone resorption. *J Cel Biochem*; 58: 424-435.
- Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, Takahashi K, Nakamura H, Suzuki J, Nagai K, Yamada T, Nakamura S-I y Yamamura H. (1991) Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-KDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem*; 266: 15790-15796.
- Taniguchi T, Takaishi K, Murayama T, Ito M, Iwata N, Chihara K, Sasaki T, Takai Y y Matsu T. (1996) Cholecystokinin-B/gastrin receptors mediate rapid formation of actin stress fibers. *Oncogene*; 12: 1357-1360.
- Tankel HI, Lester LJ, Richmen A y Hollander F. (1957) A study of the pancreatic response to histamine in dogs with total gastrectomies. *Gastroenterology*; 65: 22-45.
- Tapia JA, González A, Salido GM y García LJ. (1997) Tripsinogen secretion from the isolated guinea-pig pancreas in response to secretagogues. *Biogenic amines*; 13: 477-490.
- Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drobak B, Bjerrum PJ, Christensen SB y Hanley MR. (1989) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agent Action*; 27: 17-23.
- Thevenod F, Dehlinger-Kremer M, Kremmer TP, Christian A-L, Potter BVL y Schulz I. (1989) Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive (IsCaP) and -insensitive (IsCaP) nonmitochondrial Ca<sup>2+</sup> pools in rat pancreatic acinar cells. *J Membr Biol*; 109: 173-186.
- Thulin L y Holm I. (1977) Effect of substance P on the flow of hepatic bile and pancreatic juice. En: *Substance P*. Eds: Von Euler VS y Pernow B. Raven Press, New York. pp 247-251.

- Toescu EC, Lawrie AM, Petersen OH y Gallacher DV. (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.
- Toivola D, Goldman R, Garrod D y Ericksson J. (1997) Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments. *J Cell Sci*; 110: 23-33.
- Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Louriolle F, Duhamel L, Charon D y Kirilovsky J. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*; 266: 15771-15781.
- Trimble ER, Bruzzone R, Meehan CJ y Biden TJ. (1987) Rapid increase in inositol 1,4,5-trisphosphate, inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and cytosolic free  $Ca^{2+}$  in agonist-stimulated pancreatic acini of the rat. *Biochem J*; 242: 289-292.
- Tsunoda Y y Owiang C. (1993) Differential involvement of phospholipase A2/arachidonic acid and phospholipase C/phosphoinositol pathways during cholecystokinin receptor activated  $Ca^{2+}$  oscillations in pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Com*; 194: 1194-1202.
- Tsunoda Y, Stuenkel EL y Williams JA. (1990) Oscillatory model of calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 258: C147-C155.
- Tsunoda Y, Yoshida H, Africa L, Steil GJ y Owyang C. (1996) Src kinase pathway in extracellular  $Ca^{2+}$ -dependent pancreatic enzyme secretion. *Biochem Biophys Res Commun*; 227: 876-884.
- Turner CE. (1994) Paxillin: a cytoskeletal target for tyrosine kinases. *Bioessays*; 16: 47-52.
- Turner, CE, Glenney JR y Burridge K. (1990) Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol*; 111: 1059-1068.
- Turner CE, Schaller MD y Parsons JT. (1993) Tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase pp125<sup>FAK</sup> during development: relation to paxillin. *J. Cell Sci*; 105: 637-645.
- Ueda T, Takeyama Y, Kaneda K, Adachi M, Ohyanagi H y Saitoh Y. (1992) Protective effect of a microtubule stabilizer, taxol, on caerulein-induced acute pancreatitis in rat. *J Clin Invest*; 89: 234-243.

- Ulrich A y Schlessinger J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*; 61: 203-212.
- Umemori H, Inoue T, Kume S, Sekiyama N, Nagao M, Itoh H, Nakanishi S, Mikoshiba K y Yamamoto T. (1997) Activation of the G protein Gq/11 through tyrosine phosphorylation of the  $\alpha$  subunit. *Science*; 276: 1878-1881.
- Vale RD, Reese TS y Sheetz MP. (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*; 42: 39-50.
- Van Leemput-Coutrez M, Camus J y Christophe J. (1973) Cyclic nucleotid-dependent protein kinases of the rat pancreas. *Biochem Biophys Res Commun*; 54: 182-190.
- Vazeux R, Hoffmann PA, Tomita JK, Dickinson ES, Jasman RL, John TS y Gallatin WM. (1992) Cloning and characterization of a new intercellular adhesion molecule ICAM-R. *Nature*; 360: 485-488.
- Viguerie N, Esteve J-P, Susini C, Logsdon C, Vaysse N y Ribet A. (1987) Dexamethasone effects on somatostatin receptors in pancreatic acinar AR 42J cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 147: 942-948.
- Viguerie N, Tahiri-Jouti N, Esteve J-P, Clerc P, Logsdon C, Svoboda M, Susini C, Vaysse N y Ribet A. (1988) Functional somatostatin receptors on a rat pancreatic acinar cell line. *Am J Physiol*; 255: 113-120.
- Volpe P, Krause K-H, Hashimoto S, Zorzato F, Possan T, Meldolisei J y Lew DP. (1988) "Calciosome", a cytoplasmic organelle: hte inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  store of nonmuscle cells? *Proc Natl Acad Sci USA*; 85: 1091-1095.
- Von Schrenck T, Heinz-Erian P, Moran T, Mantey SA, Gardner JD y Jensen RT. (1989) Characterization of a neuromedin B-preferring receptor in esophagus muscle: evidence for subtypes of bombesin receptors. *Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol 19)*; 256:G747-G758.
- Waelbroek M, Camus J, Winand J y Christophe J. (1987) Different antagonist binding properties of rat pancreatic and cardiac muscarinic receptors. *Life Sci*;41:2235-2240.
- Waelbroek M, Lazareno S, Pfaff O, Friebe T, Tastenoy M, Mutscher E y Lambrecht G. (1996) Stereoselective recognition of the enantiomers of phenglutarimide and of six related compounds by four muscarinic receptor subtypes. *Br J Pharmacol*; 119: 1319-1330.

- Wagner ACC, Wishart MJ, Yule DI y Williams JA. (1992) Effects of okadaic acid indicate a role for dephosphorylation in pancreatic stimulus-secretion coupling. *Am J Physiol*; 63:C.
- Wagner ACC, Schäfer C y Williams JA. (1992) Effects of calyculin A on amylase release in streptolysin-O permeabilized acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 189: 1606-1612.
- Wakui M, Potter BVL y Petersen OH. (1989) Pulsatile intracellular calcium release does not depend on fluctuations in inositol trisphosphate concentration. *Nature*; 339: 317-320.
- Walsh MP. (1994) Regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J Physiol Pharmacol*; 72: 919-936.
- Wank SA, Jensen RT y Gardner JD. (1988) Kinetics of binding of cholecystokinin to pancreatic acini. *Am J Physiol*; 255: G106-G112.
- Watanabe G, Saito Y, Madaule P, Ishizaki T, Fujisawa K, Morii N, Mukai H, Ono Y, Kakizuka A y Narumiya S. (1996) Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein raphilin as target of small GTPase Rho. *Science*; 271: 645-650.
- Wheeler-Jones CP, May MJ, Morgan AJ y Pearson JD. (1996) Protein tyrosine kinases regulate agonist-stimulated prostacyclin release but not von Willebrand factor secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem J*; 315: 407-416.
- Wiley J y Owyang C. (1987) Somatostatin inhibits cAMP-mediated cholinergic transmission in the myenteric plexus. *Am J Physiol*; 253: 607-612.
- Wilkins JA, Risinger MA y Lin S. (1986) Studies on proteins that co-purify with smooth muscle vinculin: Identification of immunologically related species in focal adhesions of nonmuscle and Z-lines of muscle cells. *J Cell Biol*; 103: 1483-1494.
- Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zurcher G y Ziemiecki A. (1991) Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related domain define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol*; 11: 2057-2065.
- Willems PHGM, Tilly RHJ y De Pont JJHM. (1987) Pertussis toxin stimulates cholecystokinin-induced cyclic AMP formation but is without effect on secretagogue-induced calcium mobilization in exocrine pancreas. *Biochim Biophys Acta*; 928: 179-185.
- Williams, JA. (1981) Effects of antimetabolic agents on ultrastructure and intracellular transport of protein in pancreatic acini. *Methods Cell Biol*; 23: 247-258.

- Williams JS, Sankaran H, Korc M y Goldfine ID. (1981) Receptors for cholecystokinin and insulin in isolated pancreatic acini: hormonal control of secretion and metabolism. *Fed Proc*; 40: 2497-2502.
- Williams JA y Yule DI. (1993) Stimulus-secretion coupling in pancreatic acinar cells. En: *Exocrine pancreas (second edition)* Eds: Go VLW, Di Magno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA y Scheele GA. New York. Raven Press. pp 167-189.
- Wilson L, Carrier MJ y Kellie S. (1995) pp125<sup>FAK</sup> tyrosine kinase activity is not required for the assembly of F-actin stress fibres and focal adhesions in cultured mouse aortic smooth muscle cells. *J Cell Sci*; 108: 2381-2391.
- Witthuhn BA, Silvennoinen O, Miura O, Lai KS, Cwik C, Liu ET y Ihle JN. (1994) Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature*; 370: 153-157.
- Woods A y Couchman JR. (1992) Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J Cell Sci*; 101: 277-290.
- Woods A, Couchman JR, Johansson S y Hook M. (1986) Adhesion and cytoskeletal organization of fibroblasts in response to fibronectin fragments. *EMBO J*; 5: 665-670.
- Wrenn RW. (1983) Phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase and its endogenous substrate proteins in rat pancreatic acinar cells. *Life Sci*; 32: 2385-2392.
- Wrenn RW. (1984) Phosphorylation of a pancreatic zymogen granule membrane protein by endogenous calcium/phospholipid-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta*; 775: 1-6.
- Yamauchi K, Milarski KL, Saltiel AR y Pressin JE. (1995) Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signalling. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 664-668.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K y Masaki T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*; 332: 411-415.
- Yanagisawa M y Masaki T. (1989) Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci*; 10: 374-378.

- Yonei SG, Oishi K y Uchida MK. (1995) Regulation of exocytosis by the small GTP-binding protein Rho in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Gen Pharmac*; 26: 1583-1589.
- Younes M, Wank SA, Vinayek R, Jensen RT y Gardner JD. (1989) Regulation of bombesin receptors on pancreatic acini by cholecystokinin. *Am J Physiol*;256:G291-G298.
- Yu D-H, Huang SC, Wank SA, Mantey S, Gardner JD y Jensen RT. (1990) Pancreatic receptors for cholecystokinin: evidence for three receptor classes. *Am J Physiol*;258:G86-G95.
- Yu D-H, Noguchi M, Zhou Z-C, Villanueva ML, Gardner JD y Jensen RT. (1987) Characterization of gastrin receptors on guinea pig pancreatic acini. *Am J Physiol*;253:G793-G801.
- Yule DI, Blevins GT, Jr, Wagner AC y Williams JA. (1992) Endothelin increases  $[Ca^{2+}]_i$  in rat pancreatic acinar cells by intracellular release but fails to increase amylase secretion. *Biochem Biophys Acta*; 1136: 175-180.
- Yule DI, Kim ET y Williams JA. (1994) Tyrosine kinase inhibitors attenuate "capacitative"  $Ca^{2+}$  influx in rat pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 202: 1697-1704.
- Yule DI, Lawrie AM y Gallacher DV. (1991) Acetylcholine and cholecystokinin induce different patterns of oscillating calcium signals in pancreatic acinar cells. *Cell calcium*; 12: 145-151.
- Yule DI y Williams JA. (1992) U73122 inhibits  $Ca^{2+}$  oscillations in response to cholecystokinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*; 267: 13830-13835.
- Yule DI y Williams JA. (1994) Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus. En: *Physiology of the gastrointestinal tract. Tercera edición*. Ed: Johnson. Raven Press. New York. pp 1447-1467.
- Zachary I, Gill J, Lehmann W, Sinnott-Smith J y Rozengurt E. (1991) Bombesin, vasopresin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation in intact Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88: 4577-4581.
- Zachary I and Rozengurt E. (1992) Focal adhesion kinase (p125FAK): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes. *Cell*; 71: 891-894.

- Zachary I, Sinnott-Smith J y Rozengurt E. J. (1992) Bombesin, vasopresin, and endothelin stimulation of tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Identification of a novel tyrosine kinase as a major substrate. *J. Biol. Chem*; 267: 19031-19034.
- Zachary I, Sinnott-Smith J, Turner CE y Rozengurt E. (1993) Bombesin, vasopressin and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem*; 268: 22060-22065.
- Zajic G y Schacht J. (1983) Cytochemical demonstration of adenylate cyclase with strontium chloride in the rat pancreas. *J Histochem Cytochem*; 31: 25-28.
- Zeuzem S, Stryjek-Kaminska D, Caspary WF, Stein J y Piiper A. (1994) Effect of a Rab3A effector domain-related peptide, CCK, and EGF in permeabilized pancreatic acini. *Am J Physiol*; 267: 350-356.
- Zhou H y Muallen S. (1990) Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated  $Ca^{2+}$  release by  $Ca^{2+}$  in cells from peripheral tissues. *J Biol Chem*; 265: 21419-21422.
- Zhou W, Povoski SP y Bell RH, Jr. (1995) Characterization of cholecystokinin receptors and messengers RNA expression in rat pancreas: evidence for expression of cholecystokinin-A receptors but not cholecystokinin-B (gastrin) receptors. *J Surg Res*; 58: 281-289.
- Zimmermann GA, Prescott SM y McIntyre TM. (1992) Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling. *Immunol Today*; 13: 93-99.
- Zimmermann P, Schneffel S, Zeuzem S, Profrock A, Haase W y Schulz I. (1992) Effects of agonists on p21<sup>ras</sup> and ras-related proteins in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 263: 396-406.