

## EL PANCREAS PERFUNDIDO Y AISLADO COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA SECRECION

---

**Autor:** Pedro J. Camello.

---

**Dirección:** Departamento de Fisiología. Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria. Apdo 643. 10071 Cáceres.

---

### INTRODUCCION

El páncreas exocrino es uno de los modelos experimentales más empleados en el estudio de los mecanismos secretores. En las últimas dos décadas han tenido un gran auge diversas técnicas *in vitro* para el estudio de este órgano, lo que ha permitido desentrañar importantes fenómenos intracelulares. Sin embargo, en el organismo las células del páncreas se encuentran en condiciones muy distintas a las experimentales, lo que puede modificar su funcionalidad y cuestionar una parte de los resultados obtenidos *in vitro*. En cuanto a los estudios *in vivo*, adecuados para el estudio del control neuroendocrino de este órgano, no permiten la investigación de numerosos aspectos de la secreción pancreática, debido a limitaciones técnicas y de diseño experimental obvias.

Una aproximación que intenta reunir las ventajas de las técnicas «*in vivo*» e «*in vitro*» es el método del páncreas aislado y perfundido. Esta preparación experimental respeta la estructura del páncreas y lo aísla de factores externos, permitiendo la aplicación de tratamientos experimentales típicos de la investigación «*in vitro*».

La mayoría de los estudios con páncreas perfundido se ha desarrollado en la rata, seguida de otras especies como el perro, gato, cerdo, conejo y cobaya. Aunque esta técnica ha sido descrita por varios autores [ya en los años 20 se realizó en el perro—ver (1)—], nosotros comentaremos el método que goza en la actualidad de mayor aceptación y reconocimiento, desarrollada inicialmente por Kanno (2) en la rata. En este

artículo describiremos detalladamente el procedimiento experimental en esta especie, así como las modificaciones específicas con las que la hemos adaptado para el cobaya, además de analizar sus posibilidades, desventajas y las principales aportaciones a que ha dado lugar.

### VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL PANCREAS PERFUNDIDO Y AISLADO

Probablemente la mayor ventaja de esta preparación sea el que conserva la organización funcional del páncreas como órgano secretor, manteniendo la estructura polar de su epitelio glandular y su lecho vascular (1). Este método tiene sobre otras técnicas «*in vitro*» la gran ventaja de permitir el estudio de la secreción fluida, abordable de otro modo solamente *in vivo* (con sus grandes limitaciones), indirectamente mediante «patch-clamp» o por micropunción, que aporta información precisa pero limitada (3). Recientemente se ha puesto a punto un protocolo de estudio de segmentos de conductos pancreáticos «*in vitro*» (4), pero con eso se prescinde de la secreción acinar fluida, presente en varias especies. En diversos laboratorios, incluyendo el nuestro, se ha comprobado que el páncreas perfundido es muy sensible a los principales secretagogos (1, 5, 6). En comparación con otras técnicas *in vitro* tiene la gran ventaja de que no se produce una gran liberación basal de enzimas por autodigestión, por lo que la proporción secreción estimulada/secreción basal es muy satisfactoria. Otro factor probablemente importante en las respuestas es que el mantenimiento de su red vascular

excluye los problemas de déficit de oxigenación y nutrientes presentes, por ejemplo, en segmentos de tejido «in vitro» (1).

Una ventaja adicional es que es posible determinar la respuesta de este órgano a diversos factores sin excluir el efecto que tienen la insulina y otras hormonas de los islotes de Langerhans sobre la función exocrina. Esto, junto con las ventajas anteriormente indicadas hace que esta técnica genere resultados fácilmente extrapolables al individuo, lo que la diferencia de numerosas preparaciones «in vitro».

En cuanto a las desventajas, algunas son al mismo tiempo ventajas previamente descritas: la presencia de diversos tipos de tejido, entre ellos el endocrino y el lecho vascular. Si bien el duodeno también puede ser extirpado, los islotes de Langerhans no, y siempre es posible que los efectos observados en un experimento se deban en parte a las hormonas liberadas por ellos. Por otra parte, los experimentos con drogas u hormonas con un fuerte efecto vascular pueden ser difíciles de interpretar, pues aunque permiten evaluar los efectos sobre la circulación del órgano (que al fin y al cabo son parte de su acción), se haría necesario diferenciar éste de la acción directa sobre las células.

Algunos inconvenientes son de orden técnico. En primer lugar esta preparación requiere un apreciable grado de entrenamiento y/o habilidad quirúrgica. Para obtener buenos resultados es necesario traumatizar lo menos posible el páncreas, de modo que los resultados serán mejores cuanto menos se toque el órgano. En cuanto al tiempo de cirugía, aunque hay autores que no le dan demasiada importancia (3), creemos apropiado operar en no más de 1-1,5 horas (lo ideal es no exceder los 40-60 min). Además el diseño experimental tiene la misma limitación, en cuanto al número de experimentos posibles en cada preparación, que la investigación «in vivo» (sólo unos pocos, al contrario que técnicas como las preparaciones de células, acinos o lóbulos de tejido pancreático).

## PROCEDIMIENTO QUIRURGICO

*Aislamiento del páncreas de rata.*—Una vez anestesiado el animal (uretano 20 %, 1-1,5 g/kg, ip) practicamos una laparotomía media longitudinal, seguida de una incisión transversal en cada pared abdominal partiendo de los labios de la primera incisión (para evitar la hemorragia de la vena abdominal y retraer la pared abdominal colocamos dos mosquitos craneal y caudalmente a cada uno de los dos cortes transversales). Con esta extensión de la laparotomía conseguimos un amplio campo operatorio.

El tracto intestinal se rechaza a la izquierda (la derecha del animal) y se disecciona el borde pancreático-duodenal limitante con colon transversal (pliegue duodenocólico), de modo que los vasos sanguíneos que cruzan desde páncreas hacia colon se seccionan entre dos ligaduras y se separa el punto de contacto entre duodeno y colon transversal. El recto es ligado y seccionado, y a continuación desplazamos el bloque intestinal a la derecha para localizar el final del duodeno, donde termina el tejido pancreático y comienza el tejido graso mesentérico. En ese punto seccionamos el duodeno y lo canulamos para evacuar la secreción duodenal. Con esto duodeno y páncreas quedan conectados al resto del tracto intestinal tan solo por la parte de mesenterio (y sus ramas vasculares) que, partiendo del páncreas, soporta las asas intestinales (esto es, la raíz del mesoyeyuno fundamentalmente). Para extraer el paquete intestinal englobamos con una ligadura el mesenterio, distalmente a ella colocamos un mosquito y seccionamos entre ambos. En este momento el páncreas se halla enmarcado por la curvatura mayor de estómago, duodeno y cara visceral del bazo.

A continuación tomamos el estómago por la curvatura mayor y se libera de las adherencias del omento que llegan a ella, para luego ligar y seccionar la arteria gástrica izquierda y la vena gástrica anterior (que alcanzan el polo craneal del fundus). También seccionamos el esófago entre dos

ligaduras. Con esto liberamos el páncreas de todas sus conexiones a excepción de duodeno, bazo y omento mayor.

Llegados a este punto se extiende el borde más caudal del páncreas para identificar y cerrar, con ligaduras sencillas, los puntos en que se continúa con el tejido graso mesentérico. Este paso lo realizamos comenzando desde el polo ventral del bazo hasta llegar al duodeno, momento en que el estómago se gira hacia la izquierda del campo operatorio para extender así totalmente el páncreas y ligar su límite con el omento mayor, cerca de la cara dorsal de la curvatura mayor del estómago. Las dos últimas ligaduras son realizadas en el ángulo formado por curvatura mayor y duodeno; una cierra el límite páncreas-omento y la otra sirve para ligar el píloro. Todo el tejido graso limitante que había sido separado con las ligaduras se secciona entonces, además del estómago.

En este momento de la intervención el páncreas está relacionado tan sólo con el duodeno a la izquierda y el bazo a la derecha. Este último es extirpado tras cerrar el hilio vascular dividiéndolo mediante dos ligaduras sencillas, cada una cerca de un extremo de la cara visceral del órgano. Con este paso el páncreas ya se halla aislado de otros órganos.

Una vez localizada la desembocadura del conducto pancreático-biliar en duodeno, introducimos en ella una pequeña cánula metálica (< 1 mm  $\varnothing$ ), para a continuación cortar entre dos ligaduras el conducto colédoco a su salida del hígado y antes de su entrada en el páncreas, en el punto en el que discurre por encima (ventralmente en realidad) de la vena porta. El mismo procedimiento se sigue con la arteria hepática, que discurre apenas a 1 mm de distancia del colédoco, tras su origen en la arteria celíaca, también visible en ese punto.

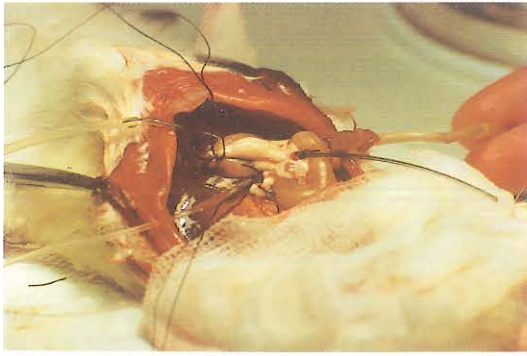
Empleando una ligadura amplia rodeamos toda la base del páncreas, esto es, la raíz dorsal del mesenterio en la que está situado este órgano. Dejando este nudo tra-

zado pero sin cerrar, se refleja el páncreas a la derecha para localizar en la raíz del mesenterio las arterias celíaca y mesentérica anterior, saliendo de la arteria aorta abdominal. Tras disecarlas se pasan ligaduras dobles para su posterior cateterización, y otra más (sencilla) alrededor de la vena porta.

La preparación está lista en este momento para la cateterización de las arterias y el inicio inmediato de la perfusión: comenzamos por la arteria celíaca, para pasar luego a la arteria mesentérica anterior. Tras la cateterización de la primera, y mientras se opera la mesentérica, se inicia la perfusión con solución fisiológica (ver más adelante) a velocidad reducida (menos de la mitad de la velocidad final); al terminar con esta segunda arteria se pasa a la velocidad normal de perfusión (2 ml/min). El tiempo empleado en canular las arterias debe ser el mínimo posible (dos minutos). Se canula entonces la vena porta con ayuda de la ligadura previamente trazada.

En este punto de la intervención quirúrgica el páncreas está ya perfundido exclusivamente con KH, y aislado de la circulación corporal. Algunos autores han utilizado esta preparación «in situ» (3, 7), que permite controlar la perfusión del páncreas dejando intacta la mayor parte de la inervación (páncreas perfundido «in situ»). El animal puede ya ser sacrificado (conviene hacerlo por exanguinación en la aorta torácica), tras lo cual se cierra la ligadura que engloba la raíz dorsal del páncreas y se secciona la inserción en la pared dorsal del abdomen, liberándolo totalmente para su colocación en el dispositivo de perfusión (ver más adelante). Tras unos 30 min de equilibrado, la preparación está lista para el comienzo del experimento.

**Aislamiento del páncreas de cobaya.**—En el caso del cobaya (Fig. 1) hemos realizado ciertos modificaciones respecto del procedimiento descrito para la rata. En primer lugar resulta más cómodo seccionar el recto antes de ligar el pliegue duodenocólico (también



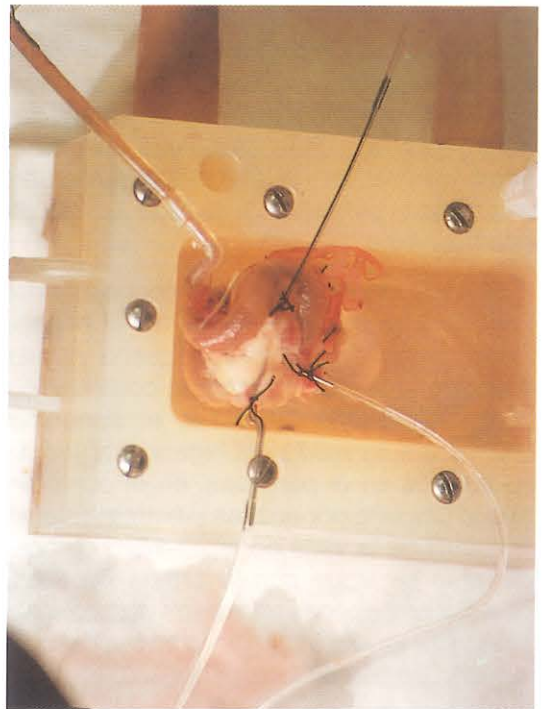
**Figura 1.**—Preparación de páncreas de cobaya perfundido «in situ». Se indican las cánulas de arteria celíaca (1), vena porta (2), duodeno (3) y conducto pancreático (4). El asa duodenal y el tejido pancreático aparecen blanquecinos al haber comenzado ya la perfusión.

puede hacerse así en rata), ya que en esta especie es muy ancho y vascularizado, y para poder diseccionar su extremo izquierdo (la derecha del campo quirúrgico) es necesario seccionar primero la base del mesocolon a su paso por el duodeno (diseccionando y ligando sus grandes vasos mesentéricos). Tras esto separamos el pliegue cecocólico que relaciona ciego, muy voluminoso en el cobaya, con colon ascendente, con lo que liberamos el colon transversal y podemos ya diseccionar el extremo derecho del pliegue duodenocólico. En cuanto a la canulación del duodeno, corto y movable en la rata, en el cobaya discurre unido al techo del abdomen a partir de la flexura caudal (relacionado con la grasa perirrenal), lo que impide desplegarlo y manejarlo con comodidad. Así, lo canulamos inmediatamente tras la flexura duodenoyeyunal. Una vez extraído el bloque intestinal, cuando se disecan las adherencias del omento mayor de la curvatura mayor del estómago, hay que tener la precaución de ligar varios vasos gastropancreáticos que cruzan esta zona. Por supuesto, el conducto biliar en el cobaya es independiente del pancreático, y ha de ser ligado y seccionado junto con la arteria hepática. Otra diferencia es que el tronco arterial celíaco incorpora las arterias celíaca y mesentérica, por lo que solamente se lleva cabo la cateterización de este vaso común. La canulación del conducto pancreático

merece una especial atención por su dificultad. En primer lugar su localización es bastante difícil al no desembocar de manera clara en el duodeno (en la rata destaca nítidamente), discurriendo oculto por el tejido pancreático. Durante la canulación no se cuenta tampoco con la ayuda que en la rata supone el flujo de bilis, hasta el punto que algunos autores (8) recurren a la administración de una pequeña dosis de secretina unos minutos antes para incrementar la secreción fluida (extremo que nosotros preferimos evitar).

## SISTEMA DE PERFUSION

**Dispositivo.**—Una vez extraída, la preparación páncreas-duodeno (ya sea de rata o de cobaya) se coloca en una cámara de perfusión termostatazada a 37-38°C, de unos 50 ml de capacidad (Fig. 2). El aumento de volumen debido a la ligera extravasación del líquido de perfusión (apenas un 10 % si el aislamiento ha sido correcto) puede conte-



**Figura 2 A.**—Dispositivo de perfusión del páncreas aislado. A, páncreas aislado situado en el baño de órgano. B, diagrama representando el dispositivo experimental.

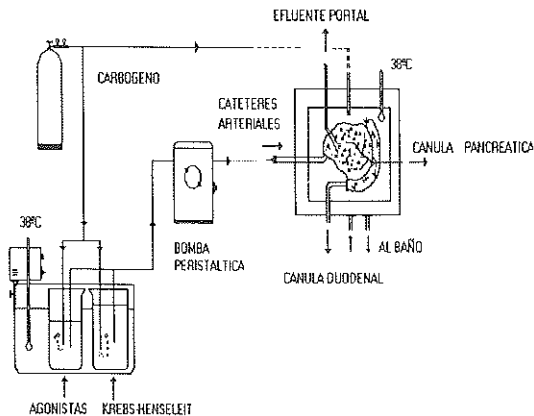


Figura 2 B.

nerse con aspiración. Aunque lo fundamental para la viabilidad del órgano sea el aporte vascular, también conviene mantener oxigenada la cámara con carbógeno. La perfusión se mantiene constante a 2 ml/min con ayuda de una bomba peristáltica. En el circuito se sitúa un captador de burbujas para evitar el riesgo de embolia gaseosa. Para administrar diferentes drogas u hormonas al páncreas situamos una llave de tres vías, lo que nos permite alternar entre la solución control y la que contiene los compuestos a investigar. Una alternativa es disponer toda la solución en un solo reservorio, pero situando en el circuito una conexión de entrada para incorporar un pequeño volumen de la droga u hormona mediante un inyector. Esto tiene la ventaja de evitar posibles desequilibrios debidos a ligeras diferencias en el líquido de perfusión entre diferentes reservorios (sobre todo cambios en el pH). Las dos cánulas situadas en las arterias del páncreas de rata están conectadas a una misma «T» para dividir entre ellas el flujo. Las situadas en duodeno y porta tienen acodamientos para permitir la evacuación sin que el páncreas se eleve sobre el nivel del baño.

Para registrar la presión de perfusión se sitúa una «T» aproximadamente a unos 30 cm antes del páncreas, conectada a un transductor de presión acoplado a un polígrafo. Normalmente las presiones de perfusión están entre 30 y 60 mm Hg («diastólica» y «sistólica» respectivamente). En cuanto al efluente venoso puede ser recogido si se

desea analizar la liberación de hormonas de los islotes de Langerhans (y duodeno) o los niveles de electrolitos y presencia de enzimas pancreáticas, además de indicarnos posibles cambios de permeabilidad del endotelio pancreático (que se traducen en cambios en el volumen de efluente portal).

**Solución empleada.**—Las soluciones empleadas por distintos autores para la perfusión del páncreas aislado son del tipo Krebs-Ringer o Krebs-Henseleit. Nosotros hemos utilizado una solución Krebs-Henseleit (KH) modificado, con la siguiente composición: NaCl 131,0 mM, KCl 5,6 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,0 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25,0 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,0 mM, Glucosa 2,5 mM. Se añade un 5 % de Dextrano T-70 (peso molecular 70.000) en el KH de perfusión para evitar la extravasación [algún autor omite esto (9)], y un 0,25 % de albúmina sérica bovina si se desea evitar la adhesión de algunos péptidos, como la secretina, a las superficies de plástico del circuito de perfusión. El pH se ajusta en 7,3-7,4, y la solución se mantiene gaseada con carbógeno. Como el pH tiene una relación estrecha con el nivel de gaseado de la solución (el principal tampón es el ión bicarbonato), es necesario vigilarlo de modo regular y cuidadoso. En nuestros experimentos hemos optado además por añadir 1 mM HEPES, que proporciona mayor estabilidad al pH. La posibilidad de sustituir el bicarbonato por HEPES tiene en contra que se reduce la secreción de jugo pancreático en la rata (no de proteínas), y de jugo y proteínas en el cobaya (1), ya que se trata de un ión que participa en el proceso celular de la secreción acinar, razón por la que lo hemos desechado.

Según nuestra experiencia es conveniente no añadir Dextrano en el líquido del baño de órgano, con lo que obtenemos una menor extravasación y edematización del mesenterio. En cuanto a la albúmina, su uso presenta el inconveniente de producir una gran cantidad de espuma al ser gaseada. Si se emplea, una solución consiste en añadir líquido antiespumante (apenas unas gotas en la superficie del líquido es suficiente) o dejar

flotar en la superficie un pequeño segmento (1 cm<sup>2</sup>) de red plástica tratada con silicona antiespumante (Merck) (24 horas en una solución al 20 % en éter y secada posteriormente).

## **ESTUDIOS CON PANCREAS AISLADO Y PERFUNDIDO**

El desarrollo de la técnica que acabamos de describir ha permitido notables avances en la fisiología pancreática, fundamentalmente en los estudios sobre la secreción exocrina. En este campo el páncreas aislado ha sido fundamental en la caracterización de la secreción enzimática (2, 10, 11), y especialmente la fracción hidroelectrolítica, acerca de la cual la información previa era limitada (3, 9-11). Con este modelo se demostró el papel que desempeñan ciertos iones como el Ca<sup>2+</sup> (2, 5, 6, 10-13), K<sup>+</sup> (10, 13-15), Cl<sup>-</sup> (9), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (9-11) y Na<sup>+</sup> (13) en la respuesta a los secretagogos. Igualmente ha servido para la investigación de la interacción entre distintos secretagogos (13, 16). En una serie de experimentos el grupo de Kanno (1, 6, 12, 17, 18) ha registrado, durante estudios de secreción, el estado de oxidoreducción de los citocromos y el potencial de membrana (mediante un espectrofotómetro de barrido de órganos), lo que ha contribuido a la comprensión de las respuestas celulares a las hormonas.

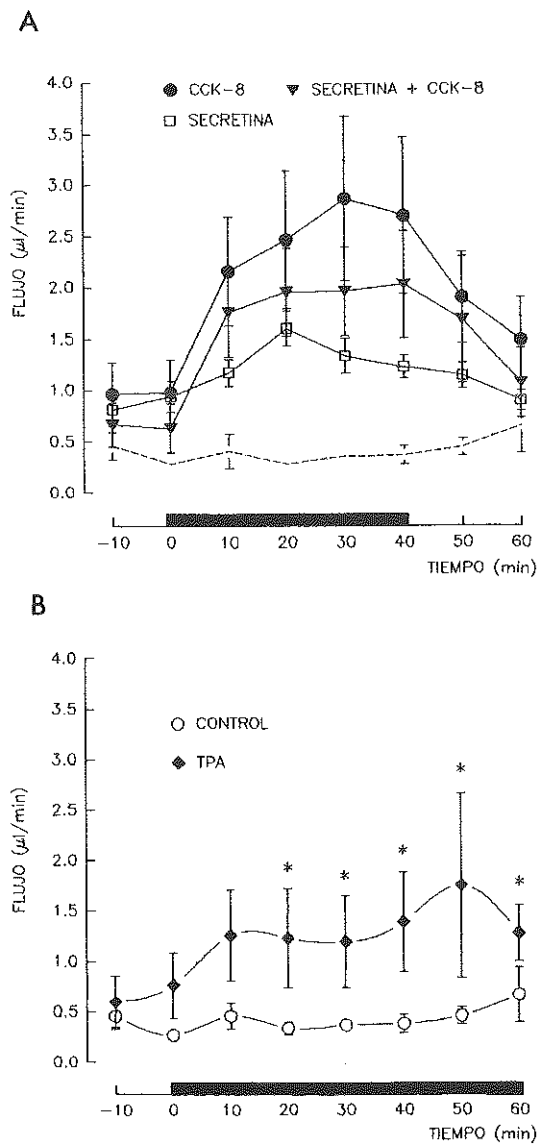
Este modelo experimental ha tenido una especial utilidad para estudiar la influencia que tienen los islotes de Langerhans sobre la función exocrina del páncreas. Los datos obtenidos por diversos investigadores indican que la insulina liberada por el propio páncreas en respuesta a la glucosa potencia los efectos de secretagogos como la CCK (15, 19) y la acetilcolina (20). Igualmente se ha avanzado con esta técnica en los mecanismos intracelulares de liberación de insulina y su regulación por la glucosa (21), demostrándose el papel de ciertas enzimas intracelulares como la proteína quinasa C (22).

También la investigación de los mecanismos celulares de captación de aminoácidos ha usado este método con éxito, caracteri-

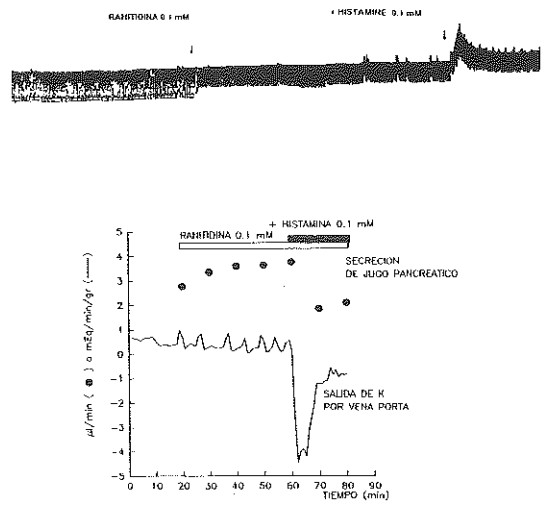
zándose en el páncreas de rata la existencia de distintos sistemas de transporte (23,24) y su estimulación por insulina y secretagogos (7, 25, 26). Otros campos que han aplicado esta preparación experimental son el estudio de las pancreatitis (27), las respuestas adaptativas del órgano a corto y medio plazo (26, 28) y el mantenimiento de la estructura epitelial y la comunicación intercelular (29).

Recientemente en nuestro laboratorio hemos utilizado esta técnica para investigar el papel del ión Mg<sup>2+</sup> en las respuestas a la colecistoquinina y la secretina (Wisdom, Singh y Salido, en preparación), y para estudiar la interacción existente entre estas dos hormonas (30). Nuestros datos indican que, como ya habíamos demostrado con otras técnicas, y contrariamente a la opinión generalmente aceptada, no se produce potenciación entre ambas hormonas, sino más bien inhibición mutua. Una observación interesante, y que concuerda con resultados contenidos en la bibliografía (31), es que el efecto de la secretina comparado con el de la colecistokinina es menor en el páncreas perfundido que «in vivo» (Camello, Wisdom, Singh y Salido, en preparación). Probablemente ello indica la existencia de algún factor cooperador o facilitador presente tan solo en el animal entero. El páncreas perfundido nos ha sido también útil para demostrar el efecto que tienen los ésteres de forbol sobre la secreción de jugo pancreático (30) (Fig. 3), siendo éste uno de los escasos resultados que implican a la proteína quinasa C en la secreción hidroelectrolítica. Durante la investigación actualmente en curso en nuestro laboratorio estamos empleando este método para caracterizar la respuesta secretora del páncreas de cobaya a la histamina, adaptándolo también para determinar las respuestas vasculares (presión de perfusión, extravasación) y los mecanismos iónicos subyacentes (análisis del efluente portal) (Fig. 4).

En conclusión, según nuestra experiencia y la de otros autores, el páncreas perfundido y aislado es una preparación muy útil en el



**Figura 3.**—**A** Secreción de jugo pancreático en el páncreas de rata aislado y perfundido en respuesta a la perfusión de CCK octapéptido, secretina o ambas a la vez (100 pM en todos los casos). La barra horizontal indica el tiempo de estimulación. La secreción se recoge, en capilares previamente tarados, cada diez minutos. Se representa también la secreción en el grupo control (línea de trazos). **B** Efectos de la perfusión del páncreas de rata aislado y perfundido con el éster de forbol 12-*O*-tetradecanoil-forbol-acetato (TPA) sobre la secreción de jugo pancreático. La perfusión con TPA (10  $\mu$ M) se prolonga durante el período indicado por la barra horizontal. La tasa de secreción se mide, por pesada, en muestras recogidas cada 10 min. Se representa también la secreción en el grupo control.\*= significativo respecto control ( $p < 0,05$ , test de Student).



**Figura 4.**—Ejemplo de registro simultáneo de secreción de jugo pancreático y salida neta de  $K^+$  en efluente venoso del páncreas aislado y perfundido de cobaya. El análisis de  $K^+$  del efluente de vena porta se realiza, en fracciones de un minuto, con un fotómetro Corning, y los resultados (línea continua, expresados respecto al peso del páncreas), se obtienen restando al  $K^+$  total en vena porta el  $K^+$  total en el líquido de perfusión cada minuto. La secreción de jugo pancreático se mide, por pesada, en muestras tomadas cada 10 min (círculos). Las barras horizontales indican el período de perfusión con un bloqueante de los receptores  $H_2$  de la histamina (ranitidina), solo o en presencia de histamina. En la parte superior aparece el registro de la presión de perfusión a lo largo del experimento.

estudio de una amplia gama de parámetros funcionales de este órgano, combinando ventajas tanto de técnicas in vivo como in vitro y presentando cualidades que lo convierten en una técnica especialmente eficaz en la fisiología del páncreas.

**Agradecimientos:** El autor desea agradecer al doctor Manuel Muñoz, de la Universidad de Málaga, su ayuda en la preparación de esta técnica, y al doctor Ginés M. Salido en la preparación de este manuscrito. El trabajo actualmente en curso está financiado por la DGICYT (PB91-0463).

**BIBLIOGRAFIA**

(1) KANNO, T. (1987): The perfused pancreas for studying exocrine secretion. En: «In vitro» methods for studying secretion Poinsner, T. y Trifaró, A. Eds. pp 45-61. Elsevier Science Publ. B V, London.

- (2) KANNO, T. (1972): Calcium-dependent amylase release and electrophysiological measurements in the cells of the pancreas. *J. Physiol.* (London) **226**: 353-371.
- (3) SCRATCHERD, T. (1986): The isolated perfused pancreas. En: *The exocrine pancreas: biology, pathobiology, and diseases*. Go, VLW; Gardner, JD; Brooks, FP; Lebenthal, E; DiMagno, EP y Scheele, GA, eds. pp: 245-253. Raven Press, New York.
- (4) CASE, R.M.; ARGENT, B.E. (1989): Pancreatic secretion of electrolytes and water. En: *Handbook of physiology. Section 6: The Gastrointestinal System. Vol III. Salivary, gastric, pancreatic and hepatobiliary secretion*. Schultz, Forte y Rauner, Eds. American Physiological Society, Bethesda, Maryland. pp: 75-85.
- (5) YOSHIDA, T.; KANNO, T. (1987): The role of extracellular calcium in the secretory response of the exocrine pancreas to secretin and forskolin. *Biomed. Res.* **8**: 233-240.
- (6) KANNO, T.; MATSUMOTO, T. (1986): Influence of extracellular  $[Ca^{2+}]$  on secretory and redox responses to CCK-8 in perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.* **251**: C10-C16.
- (7) MANN, G.E.; NORMAN, P.S.R.; HABARA, Y.; MUÑOZ, M.; PERAN, S. (1985): Regulation of basolateral aminoacid transport activity in the exocrine pancreas by insulin, acetylcholine, cholecystokinin and experimental diabetes. En: *Carrier mediated transport of solutes from blood to tissue*, Yudilevich, D.L. y Mann, G.E., Eds. pp: 77-98. Longman, London.
- (8) PADFIELD, P.J.; GARNER, A.R.; CASE, R.M. (1989): Patterns of pancreatic secretion in the anaesthetized guinea pig following stimulation with secretin, cholecystokinin octapeptide, or bombesin. *Pancreas* **4**: 204-209.
- (9) SEOW, K.T.F.; LINGARD, J.M.; YOUNG, J.A. (1986): Anionic basis of fluid secretion by rat pancreatic acini «in vitro». *Am. J. Physiol.* **250**: G140-G148.
- (10) PETERSEN, O.H.; UEDA, N. (1977): Secretion of fluid and amylase in the perfused rat pancreas. *J. Physiol.* (London) **264**: 819-835.
- (11) KANNO, T.; YAMAMOTO, M. (1977): Differentiation between the calcium-dependent effects of cholecystokinin-pancreozymin and the bicarbonate-dependent effects of secretin in exocrine secretion of the rat pancreas. *J. Physiol.* (London) **264**: 787-799.
- (12) SHIBUYA, I.; KANNO, T. (1985): Calcium-dependent secretory and redox response to CCK-8 in isolated perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.* **248**: C228-C234.
- (13) HABARA, Y. (1980): Influences of ionic environments on ACh-induced secretory responses in isolated perfused pancreas of rats. *Jpn. J. Physiol.* **30**: 561-574.
- (14) ISHIKAWA, T.; KANNO, T. (1991): Potassium transport across basolateral membrane of acinar cells in the perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.* **261**: G570-G577.
- (15) SAITO, A.; KANNO, T. (1980): Influence of insulin and external potassium concentration on secretory responses to cholecystokinin-pancreozymin in the pancreatic acinar cell. *Biomed. Res.* **1**: 146-150.
- (16) MATSUMOTO, T.; 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.
- (17) ASADA, N.; KANNO, T. (1985): Influence of pH change on redox state and CCK-induced secretion in isolated perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.* **248**: C235-C240.
- (18) KANNO, T.; HABARA, Y. (1980): The effect of acetylcholine concentration on membrane potential, redox state and secretion of the pancreatic acinar cell. *Biomed. Res.* **1**: 66-75.
- (19) SAITO, A.; WILLIAMS, J.A.; 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.
- (20) SAITO, A.; WILLIAMS, J.A.; KANNO, T. (1980): Potentiation by insulin of the acetylcholine-induced secretory response in the perfused rat pancreas. *Biomed. Res.* **1**: 101-103.
- (21) ELAHI, D.; MULLER, D.C.; ANDERSEN, D.K.; TOBIN, J.D.; ANDRES, R. (1985): The effect of age and glucose concentration on insulin secretion by the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology* **116**: 11-16.
- (22) MAKAI, Y.; NUNOI, K.; KIKUCHI, M.; FUJISHIMA, M. (1989): Effects of low-concentration Polymixin B on insulin secretion induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), glucose, or tolbutamide from the isolated perfused rat pancreas. *Metabolism* **38**: 334-337.
- (23) MANN, G.E.; MUÑOZ, M.; PERAN, S. (1987): Cationic aminoacid transport in the isolated perfused exocrine rat pancreas. *J. Physiol.* (London) **396**: 38.
- (24) MANN, G.E.; NORMAN, P.S.R.; SMITH, I.C.H. (1989): Amino acid efflux in the isolated perfused rat pancreas: trans-stimulation by extracellular amino acids. *J. Physiol.* (London) **416**: 485-502.
- (25) MANN, G.E.; NORMAN, P.S.R. (1984): Regulatory effects of insulin and experimental diabetes on neutral aminoacid transport in the perfused rat exocrine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* **778**: 618-622.
- (26) MANN, G.E.; MUÑOZ, M.; PERAN, S. (1986): Fasting and refeeding modulate neutral aminoacid transport activity in the basolateral mem-



- brane of the rat exocrine pancreatic epithelium: fasting-induced insulin sensitivity. *Biochim. Biophys. Acta* **862**: 119-126.
- (27) HONG, S.S.; CASE, R.M.; KIM, K.H. (1988): Analysis in the perfused cat pancreas of factors implicated in the pathogenesis of pancreatitis. *Pancreas* **3**: 450-458.
- (28) OTSUKI, M.; OHKI, A.; SAKAMOTO, C.; OKABAYASHI, Y.; BABA, S. (1985): Exocrine pancreatic function in rats after acute trypsin inhibitor treatment. *Dig. Dis. Sciences* **30**: 263-268.
- (29) BRUZZONE, R.; TRIMBLE, E.R.; GJINOVCI, A.; TRAUB, O.; WILLECKE, K.; MEDA, P. (1987): Regulation of pancreatic exocrine function: a role for cell-to-cell communication? *Pancreas* **2**: 262-271.
- (30) CAMELLO, P.J. (1992): Interacciones entre las principales vías de acoplamiento estímulo-secreción en el páncreas de rata. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología, Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria de Cáceres.
- (31) KANNO, T.; MATSUMOTO, T.; MORI, M.; OYAMADA, M.; NEVALAINEN, T. J. (1984): Secretin prevents hyporeactive and morphological responses of rat pancreatic acinar cells to stimulation with supraoptimal concentration of cholecystokinin-octapeptide. *Biomed. Res.* **5**: 355-370.