

VNiVERSiDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE FisiOLOGíA Y FARMACOLOGíA



TESiS DOCTORAL

**Alteraciones en células secretoras del
páncreas exocrino en modelos experimentales
de fibrosis quística y pancreatitis aguda**

María del Pilar Hernández Lorenzo
2012

María Jesús Monte Río, Directora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, certifica que la presente memoria, elaborada por Dña. María del Pilar Hernández Lorenzo para optar al Grado de Doctora en Biología por la Universidad de Salamanca, con el título "Alteraciones en células secretoras del páncreas exocrino en modelos experimentales de fibrosis quística y pancreatitis aguda", ha sido realizada bajo la dirección de los Drs. José Ignacio San Román García y Mónica García Benito, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca. Y para que conste, expide y firma el presente en Salamanca, a veinte de febrero de dos mil doce.

Mónica García Benito y José Ignacio San Román García autorizan la presentación de la memoria realizada por Dña. María del Pilar Hernández Lorenzo para optar al Grado de Doctora en Biología por la Universidad de Salamanca, con el título "Alteraciones en células secretoras del páncreas exocrino en modelos experimentales de fibrosis quística y pancreatitis aguda", que ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca. Y para que conste, expiden y firman la presente autorización en Salamanca a veinte de febrero de dos mil doce.

Este trabajo se ha financiado principalmente por los siguientes Proyectos de Investigación:

"Estudio de los mecanismos de secreción hidroelectrolítica en respuesta a cAMP en conductos pancreáticos aislados de ratones controles y con fibrosis quística", Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León. (SAN673/SA/06/08).

"Estudio de las alteraciones funcionales de las células ductulares pancreáticas implicadas en la fisiopatología de la pancreatitis aguda experimental", FIS, Instituto de Salud Carlos III , Ministerio de Ciencia e Innovación. (PI10/01059).

Detrás de cada sueño que se hace realidad siempre hay personas que nos apoyan y que creen en nosotros. Son seres especiales que nos animan a seguir adelante y que con su apoyo y aliento nos ayudan cada día a avanzar con firmeza por el camino de la superación.

Quiero que este sueño sea compartido con todos los que han hecho posible que se convierta en realidad, a quienes jamás encontraré forma de agradecer el cariño, la ayuda y la comprensión brindados en los buenos y malos momentos vividos durante esta etapa de mi vida.

GRACIAS

ABC: *ATP-binding cassette*

AE: intercambiador aniónico

cAMP: adenosín monofosfato cíclico

ANOVA: análisis de la varianza

AQP: acuaporina

ATP: adenosina trifosfato

BCECF-AM: 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(γ -6)-carboxifluoresceína, acetoximetil éster

6-Bnz: N⁶-Benzoil-cAMP

BSA: seroalbúmina bovina

BSC: cotransportador sensible a la bumetanida

[Ca²⁺]_c: concentración de calcio citosólico libre

CA: anhidrasa carbónica

CACC: canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺

CCK: colecistocinina

CFTR: regulador transmembranal de la fibrosis quística

cGKII: proteína cinasa dependiente de cGMP

CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina

D-Glc: D-glucosa

DIDS: sal disódica del ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico

DMEM: medio *Dulbecco's modified Eagle's*

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: mezcla de desoxinucleótidos

DRA: *down regulated in adenoma*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGTA: ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético

EIPA: 5-(N-etil-N-isopropil) amilorida

FBS: suero de ternera fetal

Fura-2-AM: Fura-2 acetoximetil éster

cGMP: guanosín monofosfato cíclico

GRP: péptido liberador de gastrina

H-89: N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamida dihidrocloruro
H₂DIDS: sal disódica del ácido 4,4'-diisotiocianatodihidrostilbeno-2, 2'-disulfónico
HEPES: ácido N-2-dihidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina
IP₃: inositol-1,4,5-trisfosfato
IRBIT: *IP₃R_S binding protein released with IP₃*
KCC: cotransportador K⁺-Cl⁻
kNBC: cotransportador Na⁺-HCO₃⁻ renal
NBC: cotransportador Na⁺-HCO₃⁻
NBD: dominio de unión a nucleótido
NHE: intercambiador Na⁺/H⁺
NHERF: factor de regulación del NHE
NKCC: cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻
MLCK: cinasa de la cadena ligera de la miosina
NMDG: N-metil-D-glucamina
PAT1: *putative anion transporter*
8-pCPT: 8-(4-Tioclorofenil)-2'-O-metil-cAMP
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
pH_i: pH intracelular
PKA: proteína cinasa A
PKC: proteína cinasa C
pNBC: cotransportador Na⁺-HCO₃⁻ pancreático
S.E.M.: error estándar de la media
SBTI: inhibidor de tripsina de soja
SDS: dodecil sulfato sódico
SLC: *solute linked carrier*
TSC: cotransportador sensible a la tiazida
UTP: uridina trifosfato
VACC: canales de Cl⁻ dependientes de volumen
VIP: péptido intestinal vasoactivo

INTRODUCCIÓN	1
1. Secreción pancreática exocrina hidroelectrolítica	3
1.1. Origen y composición de la secreción pancreática hidroelectrolítica	3
1.2. Mecanismos de secreción ductular	5
1.2.1. Modelo clásico	6
1.2.2. Transporte de iones a través de la membrana basolateral	7
1.2.3. Transporte de iones a través de la membrana apical	15
1.2.4. Transporte transepitelial de H ₂ O: acuaporinas	20
1.2.5. Modelo actualizado	21
1.3. Regulación de los mecanismos de secreción ductular	22
1.3.1. Vía del cAMP-PKA (Secretina)	22
1.3.2. Vía del Ca ²⁺ (Acetilcolina)	24
1.3.3. Activación de la secreción por cGMP	25
1.3.4. Relaciones entre transportadores	25
2. Fracción acinar de la secreción pancreática exocrina	27
2.1. Estructura del acino pancreático	27
2.2. Fisiología de las células acinares	29
2.2.1. Generalidades	29
2.2.2. Regulación de la secreción	29
2.2.3. Rutas de señalización intracelular	30
3. Pancreatitis aguda	32
3.1. Generalidades	32
3.2. Modelos experimentales de pancreatitis aguda	33
3.2.1. Modelos <i>in vivo</i> no invasivos	34
3.2.2. Modelos <i>in vivo</i> invasivos	35
3.2.3. Modelos <i>ex vivo</i>	36
3.3. Pancreatitis aguda inducida por ceruleína	36
3.4. Pancreatitis aguda inducida por L-arginina	38
3.5. Pancreatitis aguda inducida por taurocolato sódico	39
3.6. Papel de las células ductulares en la fisiopatología de la pancreatitis aguda	40
4. Fibrosis quística	43
4.1. Generalidades	43
4.2. Modelos experimentales de fibrosis quística	44
4.2.1. Modelos de ratones para el estudio de la fibrosis quística	44
4.2.2. Modelo de fibrosis quística en cerdos recién nacidos	48

OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. Productos químicos	59
2. Animales y tratamientos	61
2.1. Genotipaje de ratones de la cepa $Cftr^{tm1Cam}$	63
3. Control histológico de la gravedad de la pancreatitis aguda	67
4. Estudios en conductos pancreáticos aislados	68
4.1. Aislamiento y cultivo de conductos pancreáticos	68
4.2. Medida de la secreción ductular por videomicroscopía	70
4.3. Medida del pH intracelular en células ductulares	78
5. Estudios en células ductulares pancreáticas aisladas	84
5.1. Aislamiento de células ductulares pancreáticas	84
5.2. Análisis de las corrientes aniónicas por <i>patch-clamp</i>	85
6. Estudios en acinos pancreáticos aislados	90
6.1. Obtención de acinos pancreáticos	90
6.2. Análisis de la secreción de amilasas	92
6.3. Medida de la concentración de calcio citosólico libre	94
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
1. Análisis de los mecanismos intracelulares implicados en la activación de la secreción en conductos pancreáticos de ratones normales y CF	101
1.1. Efectos de la inhibición de la proteína cinasa A (PKA) en la respuesta secretora de conductos pancreáticos de ratones normales y CF	101
1.1.1. Respuesta de los conductos pancreáticos de ratones normales y CF a la estimulación con forskolina	101
1.1.2. Efecto de la inhibición de la actividad de la PKA sobre la secreción estimulada con forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales y CF	105
1.1.3. Efecto de la inhibición de la actividad de la PKA sobre la secreción dependiente de HCO_3^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales y CF	108
1.1.4. Secreción de HCO_3^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones CF	111
1.1.5. Efecto de la inhibición de la actividad de la PKA sobre la secreción de Cl^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales y CF	114
1.1.6. Efecto de la inhibición de la PKA con una concentración mayor de H-89 (50 μM) en conductos pancreáticos de ratones normales	120

1.1.7. Efecto de la inhibición de la actividad de la PKA tras la estimulación de la secreción con carbacol en conductos pancreáticos de ratones normales	122
1.2. Análisis de la respuesta secretora en conductos pancreáticos de ratones normales a agonistas selectivos de PKA o de Epac	125
1.2.1. Respuesta secretora de los conductos pancreáticos de ratón a N ⁶ -Benzoil-cAMP	125
1.2.2. Respuesta secretora de los conductos pancreáticos de ratón a 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	128
1.2.3. Respuesta secretora de los conductos pancreáticos de ratón a elevadas concentraciones de los análogos del cAMP	130
1.2.4. Efectos de la acción conjunta del carbacol y el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre la secreción ductular en ratones	134
2. Estudios en acinos pancreáticos aislados de ratones normales y CF	137
2.1. Análisis de la secreción de amilasas	137
2.2. Medida de la concentración de calcio citosólico libre	140
3. Análisis electrofisiológico de las corrientes aniónicas en células ductulares de ratones normales y CF	145
3.1. Corrientes aniónicas estimuladas por forskolina + IBMX o por carbacol en células de ratones normales	146
3.2. Corrientes aniónicas estimuladas por forskolina + IBMX o por carbacol en células de ratones CF	149
4. Funcionalidad de los conductos pancreáticos de rata en la pancreatitis aguda experimental	154
4.1. Control histológico de la gravedad de la pancreatitis aguda	154
4.1.1. Cambios histológicos durante la pancreatitis aguda inducida por taurocolato	154
4.1.2. Cambios histológicos durante la pancreatitis aguda inducida por ceruleína y L-arginina	156
4.2. Efectos de la pancreatitis aguda inducida por infusión retrógrada de taurocolato sódico en la respuesta secretora de los conductos pancreáticos de rata	158
4.3. Efectos de la pancreatitis aguda inducida por L-arginina en la respuesta secretora de los conductos pancreáticos de rata	161
4.4. Efectos de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína en la respuesta secretora de los conductos pancreáticos de rata	164
4.4.1. Estudio del posible efecto directo de la ceruleína sobre la respuesta secretora de conductos pancreáticos aislados de ratas controles	164
4.4.2. Respuesta secretora a forskolina de conductos pancreáticos aislados de ratas controles y ratas con pancreatitis	167

4.4.3. Secreción de Cl^- en respuesta a la estimulación con forskolina en conductos pancreáticos aislados de ratas control y ratas con pancreatitis	169
4.4.4. Papel del NHE1 en la secreción de HCO_3^- estimulada con forskolina en conductos pancreáticos aislados de ratas control y ratas con pancreatitis	171
4.4.5. Papel del pNBC1 en la secreción dependiente de HCO_3^- estimulada con forskolina en conductos pancreáticos aislados de ratas control y ratas con pancreatitis	173
4.4.6. Secreción dependiente de HCO_3^- en respuesta a la estimulación con carbacol en conductos pancreáticos aislados de ratas control y ratas con pancreatitis	175
4.4.7. Papel del pNBC1 en la secreción de HCO_3^- estimulada con carbacol en conductos pancreáticos aislados de ratas control y ratas con pancreatitis	178
4.5. Análisis de la funcionalidad de transportadores de membrana, por medida del pH intracelular, en la pancreatitis aguda inducida por ceruleína	181
4.5.1. Recuperación del pH_i tras una carga ácida en células ductulares pancreáticas de ratas normales y ratas con pancreatitis	181
4.5.2. Papel del pNBC1 en la recuperación del pH_i tras una carga ácida en células ductulares pancreáticas estimuladas con forskolina de ratas normales y ratas con pancreatitis	191
CONCLUSIONES	199
BIBLIOGRAFÍA	203

INTRODUCCIÓN

1. SECRECIÓN PANCREÁTICA EXOCRINA HIDROELECTROLÍTICA

1.1. Origen y composición de la secreción pancreática hidroelectrolítica

El páncreas exocrino está constituido fundamentalmente por tres tipos de células: acinares, centroacinares y ductulares. Las células ductulares forman los conductos pancreáticos, que constituyen el denominado árbol ductal.

El árbol ductal pancreático tiene tres funciones principales:⁴⁶ función estructural, como soporte para el tejido acinar, función transportadora, al llevar la secreción de enzimas digestivas desde los acinos hasta el duodeno, y función secretora, al ser las células ductulares las responsables de la secreción del componente hidroelectrolítico del jugo pancreático, caracterizado en todas las especies por su elevado contenido en HCO_3^- . Este componente arrastra las enzimas pancreáticas a través del árbol ductal, permitiendo que el jugo pancreático, al llegar al intestino delgado, neutralice el quimo ácido procedente del estómago, aportando el ambiente necesario para la digestión de los nutrientes.

Atendiendo a criterios anatómicos e histológicos, los conductos pancreáticos se diferencian en cuatro tipos:¹⁶ los acinos drenan su secreción en los conductos intercalares; estos se fusionan, formando los conductos intralobulares,³ que a su vez se unen entre sí, dando lugar a los conductos interlobulares. En la mayoría de las especies, incluyendo cobaya, gato, perro y hombre, los conductos interlobulares se unen en el llamado conducto principal, que desemboca en el duodeno. Sin embargo, en otras especies, como ratón, rata y hámster, los conductos interlobulares pancreáticos vierten su contenido en el conducto biliar, formando un conducto biliopancreático común, que será el que desemboque en el intestino.⁴⁷

La actividad secretora de las diferentes clases de conductos varía entre especies. En el páncreas humano los transportadores clave se expresan mayoritariamente en conductos intercalares,^{35,66,225,226,291} lo que sugiere que es allí donde se produce una mayor secreción de fluido y HCO_3^- ; sin embargo, en el páncreas de rata esto ocurre sobre todo en los conductos interlobulares.^{98,187,291,340} Por otro lado, en algunas especies, los conductos interlobulares y principales del páncreas parecen ser responsables de fenómenos de reabsorción de HCO_3^- .²⁰⁶

El sistema ductular del páncreas está rodeado por un plexo vascular²⁴⁸ y recibe fibras nerviosas procedentes del sistema nervioso autónomo y del sistema nervioso entérico, así como fibras procedentes del sistema de inervación intrínseco, formado por ganglios y fibras localizados en el tejido conectivo interlobular.¹⁴⁶

El componente hidroelectrolítico del jugo pancreático está formado por agua e iones, entre los cuales el más característico es el HCO_3^- . Contiene también Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} y, en menor proporción, Mg^{2+} y HPO_4^{2-} . Además, las células ductulares también secretan mucinas.

Aunque la osmolaridad del jugo pancreático es semejante a la del plasma e independiente de la tasa de secreción, el volumen y composición del jugo pancreático secretado en respuesta a distintos estímulos varía de unas especies a otras.³²⁷

El HCO_3^- presente en el jugo pancreático procede de las células ductulares y centroacinares.¹⁴⁵ En todas las especies estudiadas, la concentración de HCO_3^- en el jugo pancreático está directamente relacionada con la tasa de secreción. Sin embargo, la cantidad máxima de HCO_3^- secretado en respuesta a distintos estímulos varía mucho de unos animales a otros. La mayoría de las especies secretan concentraciones máximas de HCO_3^- superiores a 120 mM; esto sucede en el perro,³¹ gato,⁴¹ cerdo,²⁶⁶ conejo,³⁰² hámster,⁸ cobaya²⁵² y hombre.⁷⁸ Sin embargo, en el caballo,⁶⁵ rata³⁰³ y ratón²²² la concentración de HCO_3^- del jugo pancreático no supera los 70 mM, y en la vaca los 90 mM.³⁴⁵

La concentración de Cl^- del jugo pancreático presenta un patrón especular con respecto a la de HCO_3^- . En todas las especies estudiadas, la suma de la concentración de ambos iones en el jugo pancreático permanece constante, independientemente de la tasa de secreción; de ahí que, en algunos trabajos, la concentración de HCO_3^- en el jugo pancreático se calcule indirectamente, a partir de la de Cl^- .^{252,299}

El aumento de la secreción hidroelectrolítica tras la estimulación está asociado con una disminución en la concentración de Cl^- en el jugo pancreático. Así, a las tasas secretoras más altas, la concentración de Cl^- es aproximadamente de 20 mM, salvo en la rata,³⁰³ ratón,²²² vaca³⁴⁵ y caballo,⁶⁵ en las que esta concentración es netamente superior (alrededor de 80

mM). Sin embargo, a tasas más bajas de secreción, la concentración de Cl^- es mayor, del orden de 80 a 120 mM, dependiendo de la especie y del estímulo.³⁰⁰

Aunque se han descrito pequeñas variaciones entre distintas especies, la concentración de Na^+ en el jugo pancreático suele ser muy similar a la plasmática; esto es así en gato,⁴² rata,³⁰³ cobaya²⁵² ratón²²² y conejo.^{221,302}

En cuanto a la concentración de K^+ en la secreción pancreática, se mantiene parecida a la plasmática en el gato,⁴² perro³¹ y cobaya,²⁵² mientras que en otras especies, como el conejo,^{302,335} la concentración de K^+ en el jugo pancreático es ligeramente superior a la del plasma.

Las concentraciones de ambos cationes no se ven alteradas con las distintas tasas secretoras, siendo constantes con los distintos flujos de jugo pancreático en prácticamente todas las especies. La rata constituye una excepción, puesto que en esta especie la concentración de K^+ se incrementa al estimular el páncreas con secretina.³⁰³

Las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el jugo pancreático son generalmente menores que las plasmáticas, y esta diferencia es mucho más acentuada para el HPO_4^{2-} . La concentración de estos tres iones en el jugo pancreático disminuye al aumentar la tasa secretora.³⁰⁰

1.2. Mecanismos de secreción ductular

La secreción de las células ductulares del páncreas está regulada por distintos factores, tanto nerviosos como hormonales, que la estimulan o la inhiben, a través de rutas de señalización intracelular mediadas por mensajeros como cAMP, Ca^{2+} o cGMP. En todos los casos, los responsables últimos de la secreción hidroelectrolítica en el páncreas exocrino son una serie de proteínas transmembranales, que constituyen canales, bombas, cotransportadores o intercambiadores de iones. Estas proteínas están localizadas, de forma polarizada, en ambas membranas de la célula ductular y, tras ser activadas, permiten el paso de unos u otros iones en una dirección determinada.

A pesar de que los mecanismos de secreción de electrolitos en las células ductulares del páncreas han recibido una considerable atención, los fenómenos de transporte epitelial en estas células todavía no están totalmente caracterizados. Esto se debe fundamentalmente a la existencia de grandes diferencias interespecíficas en los mecanismos de transporte iónico.

En 1988, dos grupos de investigación^{110,241} propusieron de forma simultánea un modelo de secreción de iones en células ductulares pancreáticas que, por primera vez, era capaz de integrar la mayoría de las observaciones experimentales realizadas hasta esa fecha. Este "modelo clásico", que describiremos a continuación, ha servido como punto de partida para todos los estudios posteriores de los mecanismos de transporte iónico en los conductos pancreáticos.

1.2.1. Modelo clásico

El modelo clásico de secreción hidroelectrolítica en células ductulares pancreáticas (Figura 1) postula que el CO_2 difunde libremente a través de la membrana basolateral³⁹ y, tras su hidratación (reacción catalizada por la anhidrasa carbónica), se generan H^+ y HCO_3^- . Los H^+ producidos abandonan la célula a través de la membrana basolateral por un intercambiador Na^+/H^+ , que opera gracias al gradiente de Na^+ generado por la Na^+,K^+ -ATPasa. El K^+ introducido a la célula la abandona a través de canales de K^+ basolaterales. La secreción de HCO_3^- a través de la membrana luminal se realiza, fundamentalmente, por medio de un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, acoplado a un canal de Cl^- regulado por secretina, que crea un gradiente de Cl^- que media esta secreción. El Na^+ y el K^+ son conducidos por vía paracelular, gracias a una pequeña diferencia de potencial transepitelial, y el agua lo hace por arrastre osmótico.

La implicación de estos transportadores de membrana en la secreción ductular pancreática está clara; sin embargo, este modelo no es capaz de explicar la capacidad de los conductos de muchas especies, incluido el hombre, de secretar HCO_3^- a concentraciones iguales o mayores de 140 mM.^{47,322} Además, la inhibición de la anhidrasa carbónica no reduce la secreción de HCO_3^- más allá de un 50% en el hombre,⁸¹ lo que sugiere la existencia de otro mecanismo que contribuye a la acumulación de HCO_3^- y es independiente de la actividad de esta enzima. En los últimos años se han identificado nuevos mecanismos de transporte iónico en las células

ductulares pancreáticas y se ha tratado de describir modelos más adecuados que permitan explicar la secreción de concentraciones altas de HCO_3^- .³²⁷

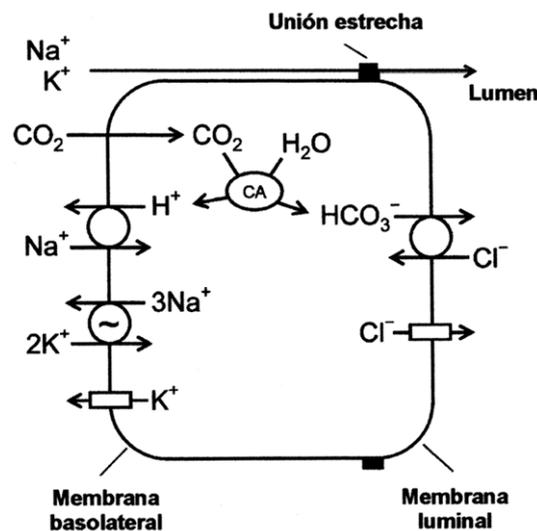


Figura 1: Modelo clásico propuesto para el mecanismo de secreción de HCO_3^- en las células ductulares pancreáticas. El HCO_3^- intracelular, que proviene del CO_2 a través de la reacción catalizada por la anhidrasa carbónica (CA), abandona la célula mediante su intercambio con Cl^- , el cual pasa al lumen a través de un canal de Cl^- regulado por secretina. Los H^+ abandonan la célula por un intercambiador Na^+/H^+ , presente en la membrana basolateral; el gradiente para la entrada de Na^+ es mantenido por la Na^+,K^+ -ATPasa. Los canales basolaterales de K^+ permiten la recirculación de los iones K^+ introducidos en la célula por la bomba, y ayudan a mantener el potencial de membrana. Los iones Na^+ y K^+ entran a formar parte de la secreción por vía paracelular, atravesando las uniones estrechas. Modificado de Steward *et al.*³²⁷

1.2.2. Transporte de iones a través de la membrana basolateral

Se han descrito dos posibles fuentes de HCO_3^- en los conductos pancreáticos: la primera es la que proponía el modelo clásico, es decir que el HCO_3^- se genera dentro de la célula mediante la acción catalítica de la anhidrasa carbónica y que los H^+ liberados en esta reacción abandonan la célula a través del intercambiador Na^+/H^+ . El otro mecanismo sería la entrada directa de HCO_3^- a través de un transportador en la membrana basolateral. Ambos mecanismos están presentes en las células ductulares y su contribución varía dependiendo de las especies.³²⁷

Intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE)

La participación de un intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE) basolateral en la secreción de HCO₃⁻ se sugirió por primera vez tras estudios realizados en el páncreas de conejo.^{335,336}

Son muchos los resultados experimentales que demuestran la presencia de este intercambiador en la membrana basolateral de los conductos pancreáticos de conejo, rata o cobaya.^{75,154,336,386} Además, se ha demostrado, mediante inmunohistoquímica, la expresión de dos isoformas del NHE, NHE1 y NHE4, en la membrana basolateral de las células acinares y ductulares del páncreas de rata,²⁸¹ y la presencia del NHE1 en la membrana basolateral de las células ductulares de ratón.^{90,206}

Por otro lado, se ha descrito la expresión de un intercambiador Na⁺/H⁺ en la membrana apical de conductos principales de distintas especies.^{206,227,386} Este intercambiador, identificado como el NHE3, mediaría la reabsorción de Na⁺ y HCO₃⁻ del jugo pancreático en la porción final del árbol ductal, regulando la concentración final de HCO₃⁻ que se secreta tras la estimulación.²⁰⁶

Aunque no hay dudas en cuanto a la presencia del NHE1 en la membrana basolateral de las células ductulares pancreáticas, y a su importancia en la regulación del pH intracelular en estas células,³⁸⁶ el papel de este intercambiador en la secreción de HCO₃⁻ no está tan claro. La amilorida, un bloqueante del NHE, no afecta a la secreción de jugo pancreático tras la estimulación con secretina en el conejo¹⁹⁵ o en el cerdo,^{122,356} y tiene un efecto limitado en especies como la rata o el gato.^{86,377} Además, se ha demostrado que la acumulación de HCO₃⁻ a través de la membrana basolateral solo se inhibe parcialmente tras el tratamiento con amilorida en conductos pancreáticos aislados del cobaya¹⁵⁴ y del ratón.⁹¹ No se ha encontrado actividad intercambiadora Na⁺/H⁺ en la secreción de HCO₃⁻ estimulada por forskolina en CAPAN-1, una línea celular procedente de células ductulares pancreáticas humanas.⁵⁷

Cotransportador Na⁺-HCO₃⁻ (NBC)

La entrada directa de HCO₃⁻ a través de la membrana basolateral se demostró al encontrarse la actividad de un cotransportador Na⁺-HCO₃⁻ (NBC).^{75,154,362,386} La primera prueba de la participación de este mecanismo en la secreción de HCO₃⁻ se obtuvo en conductos

pancreáticos aislados de rata,³⁸⁶ en los que se analizó la recuperación del pH intracelular tras una carga ácida. Estos estudios demostraron que los conductos presentaban un mecanismo de recuperación, dependiente de Na^+ y de HCO_3^- , e insensible a amilorida, que podía bloquearse de forma reversible cuando se aplicaba H_2DIDS a su membrana basolateral.³⁸⁶ Resultados similares se han obtenido en estudios llevados a cabo en cerdo³⁶² y cobaya.^{75,154,158} En esta última especie se ha demostrado, mediante la inhibición de la actividad del NBC, que la contribución de este cotransportador a la acumulación de HCO_3^- en la célula ductular pancreática estimulada por secretina es bastante mayor que la del NHE.¹⁵⁶ En este sentido, se ha demostrado que la secreción de HCO_3^- se inhibe un 56% cuando los conductos se tratan con H_2DIDS , un 18% cuando el tratamiento se realiza con un análogo de la amilorida, y se anula completamente cuando ambos inhibidores se aplican a la vez.¹⁵⁶ Además, se ha demostrado la participación del cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ en la acumulación de HCO_3^- en células ductulares del ratón.⁹¹

Se ha clonado la isoforma pancreática humana del NBC, pNBC1, y se ha localizado, mediante hibridación *in situ*, en acinos y conductos pancreáticos;¹ también se ha observado, mediante inmunohistoquímica, su expresión en la membrana basolateral de células ductulares humanas²²⁶ y de rata,^{291,346} aunque en estudios posteriores en la especie humana no se pudo distinguir si este marcaje se producía con la isoforma pancreática, pNBC1, o con la renal, kNBC1.¹²⁰

El cotransportador pNBC1 es electrogénico; la estequiometría $1\text{Na}^+:2\text{HCO}_3^-$ se ha demostrado en células ductulares de ratón.¹²⁰ Aunque no hay datos equivalentes para el pNBC1, se ha descrito que la estequiometría del kNBC1 puede modificarse por su fosforilación por la proteína cinasa A (PKA).¹²¹ El papel del pNBC1 en la secreción pancreática de HCO_3^- viene determinado por esta estequiometría: dado que es un cotransportador electrogénico, la dirección en que se produzca el transporte dependerá no solo de los gradientes de concentración para el Na^+ y el HCO_3^- , sino también del potencial de membrana.

Cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC)

Hace años, varios estudios de secreción pancreática indicaban que la secreción de fluido era totalmente dependiente del transporte de HCO_3^- .^{12,175,259} Esto es así en especies como el cobaya;^{91,156} sin embargo, los conductos de algunas especies son capaces de secretar, en

ausencia de HCO_3^- , un fluido rico en Cl^- . Incluso en presencia de HCO_3^- , el transporte de Cl^- en los conductos de rata y ratón es responsable de hasta un 40% de la secreción total de fluido.^{91,327}

En numerosos epitelios, la entrada de Cl^- a la célula está mediada por fenómenos de cotransporte, que operan a favor del gradiente de Na^+ . Se han descrito varios cotransportadores de catión- Cl^- asociados al Na^+ : el NKCC1, o BSC2 (*bumetanide-sensitive cotransporter 2*), está ampliamente distribuido en los mamíferos y es especialmente abundante en las membranas basolaterales de células epiteliales del intestino y de los túbulos renales, donde es el responsable del transporte de Na^+ y Cl^- desde el líquido intersticial al interior celular. El NKCC2, BSC1 o cotransportador renal, está presente solo en la membrana apical de las células epiteliales de la rama ascendente gruesa del asa de Henle.¹⁷⁶ El último cotransportador de esta familia es el Na^+ - Cl^- , NCC o TSC, que se encuentra únicamente en la membrana apical de las células del túbulo distal renal de mamíferos.¹⁵²

La secreción de Cl^- en conductos pancreáticos de rata y ratón puede bloquearse por completo por la bumetanida, lo que sugiere la intervención de un cotransportador Na^+ - K^+ - 2Cl^- ;⁹¹ se ha demostrado la expresión de la isoforma NKCC1 en la membrana basolateral de células ductulares pancreáticas de rata y ratón y que su actividad media la secreción de Cl^- en estas dos especies.⁹¹ El Cl^- acumulado en el interior celular se transporta al lumen a través de canales de Cl^- , el Na^+ se devuelve a la sangre por la Na^+ , K^+ -ATPasa y el K^+ abandona la célula a través de los canales de K^+ presentes en la membrana basolateral.²⁴⁰

En líneas celulares de origen humano, CAPAN-1 y CFPAC-1, se ha descrito la actividad de un NKCC en la membrana basolateral, responsable de la acumulación de Cl^- en la célula.⁵⁷ También se ha observado, mediante inmunohistoquímica, la presencia de NKCC1 en la membrana basolateral de algunas células ductulares en conductos pancreáticos humanos de gran calibre,⁹⁰ aunque no parece probable que en este caso el NKCC1 medie la secreción de Cl^- , ya que los conductos más distales del árbol ductal humano carecen de los mecanismos de transporte necesarios para la secreción de agua y electrolitos.³⁵

El cotransportador K^+ - Cl^- , KCC1, otro miembro de la superfamilia de cotransportadores catión- Cl^- ,¹³² se ha detectado en el páncreas humano¹⁰⁵ y en conductos intralobulares de rata.²⁸²

Aunque no hay datos funcionales, se cree que el KCC1 mediaría el transporte acoplado y electroneutro de K^+ y Cl^- a través de la membrana basolateral y estaría implicado en la regulación del volumen celular.²⁸²

Na⁺,K⁺-ATPasa

La ausencia de los cationes Na^+ y K^+ en el medio de perfusión del páncreas provoca una disminución de la tasa secretora, que resulta más acentuada en el caso de la ausencia de Na^+ .^{41,43,280,336} Esta dependencia de la presencia de Na^+ y K^+ en el medio de perfusión se ha explicado por la falta de actividad de la Na^+,K^+ -ATPasa en esas condiciones. Esta ATPasa funciona sacando 3 cationes Na^+ por cada 2 K^+ que introduce en la célula y por cada ATP hidrolizado,¹⁸⁰ esto crea un gradiente de Na^+ favorable a su entrada y un gradiente de K^+ que favorece su salida. El gradiente de Na^+ es utilizado por otros transportadores (NHE1, pNBC1 y NKCC1) que, de forma activa secundaria, intercambiarán o cotransportarán H^+ , HCO_3^- o Cl^- con el Na^+ .³²⁷

La presencia de la Na^+,K^+ -ATPasa se ha descrito en la membrana basolateral de los conductos pancreáticos de rata,²¹⁸ conejo,¹⁹⁵ cobaya,¹⁵⁸ gato,³⁴ y perro.³²⁰ También se ha demostrado que, en el ratón, el intercambiador NHE1 opera gracias al gradiente de Na^+ creado por la Na^+,K^+ -ATPasa a través de la membrana basolateral.^{45,240,300}

El bloqueo de la Na^+,K^+ -ATPasa por ouabaína provoca una inhibición de la secreción de HCO_3^- en diferentes especies.^{43,158,162,195,336} También en la línea celular CAPAN-1 la ouabaína bloquea la corriente transepitelial estimulada por la forskolina, inhibiendo la secreción de HCO_3^- .²⁷³

Todos estos resultados indican que la Na^+,K^+ -ATPasa, o más concretamente el gradiente de Na^+ creado por ella a través de la membrana basolateral, juega un papel fundamental en la secreción pancreática ductular.^{45,240,300}

H⁺-ATPasa

Como ya se ha descrito anteriormente, los H^+ generados en la reacción mediada por la anhidrasa carbónica salen de la célula ductular a través del intercambiador Na^+/H^+ de la membrana basolateral. Sin embargo, en el caso de la línea de células ductulares humanas,

CAPAN-1, no se ha encontrado actividad intercambiadora Na^+/H^+ en la secreción de HCO_3^- estimulada por forskolina.⁵⁷ Esta secreción tampoco se inhibió por H_2DIDS (descartando así la participación del pNBC1), pero sí por un inhibidor específico de la H^+ -ATPasa vacuolar, sugiriendo que, en conductos pancreáticos humanos, los H^+ abandonarían la célula a través de este mecanismo de transporte activo primario.⁵⁷

La presencia de la H^+ -ATPasa vacuolar en la membrana basolateral se ha demostrado en conductos pancreáticos de cerdo^{239,357,358,362} y rata.³⁸⁶

Estudios funcionales, basados en la medida de corrientes transepiteliales, han puesto de manifiesto la importancia de la H^+ -ATPasa de tipo vacuolar, V- H^+ -ATPasa, en la respuesta secretora de las células ductulares pancreáticas del cerdo.²⁶⁷ Esta bomba de protones se insertaría, tras la estimulación de la célula ductular, en su membrana basolateral, por exocitosis de unas tubulovesículas portadoras.²⁶⁷

El papel de la H^+ -ATPasa en la secreción de HCO_3^- en conductos pancreáticos de rata no está claro, ya que, aunque se han encontrado pruebas de su actividad al analizar la recuperación del pH intracelular tras una carga ácida, se ha observado una inactividad relativa de esta bomba en los rangos fisiológicos de pH_i .³⁸⁶

En cuanto a otras especies, como el cobaya, la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar es evidente tras la estimulación de los conductos con secretina y carbacol;⁷⁵ sin embargo, la bafilomicina A_1 , un bloqueante de la H^+ -ATPasa, no inhibe la secreción de HCO_3^- estimulada por secretina,^{155,156} lo que sugiere que esta ATPasa no contribuye de forma significativa a la secreción. Tampoco se ha encontrado un papel relevante para la H^+ -ATPasa de tipo vacuolar en la secreción de electrolitos en el páncreas del ratón.⁹¹

Canales de K^+

El gradiente de K^+ , generado por la Na^+,K^+ -ATPasa en células ductulares pancreáticas, se disipa a través de canales de K^+ .²⁴⁰ Los canales de K^+ , identificados en muchas células epiteliales secretoras de Cl^- , tienen tres funciones:⁴⁶ 1) permiten la salida de la célula del K^+ acumulado por la Na^+,K^+ -ATPasa, 2) aportan la fuerza eléctrica necesaria para la secreción de Cl^- , al

hiperpolarizar la célula, y 3) provocan un flujo de corriente hacia el polo basolateral, que proporciona equilibrio frente a la salida electrogénica apical de Cl^- .

Se han identificado tres tipos de canales de K^+ , que presentan distinta conductancia, en la membrana basolateral de las células ductulares pancreáticas de rata.³²⁷ El primero es un maxi- K^+ o canal de K^+ de alta conductancia, que se activa por despolarización y por un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico libre,⁴⁶ y que no parece contribuir a la conductancia de K^+ en células ductulares en reposo.²⁴⁰ Los otros dos canales de K^+ son de menor conductancia y estarían en principio implicados en el mantenimiento del potencial de membrana en células no estimuladas.²⁶³

Aunque clásicamente se ha considerado que los canales maxi- K^+ se expresaban en la membrana basolateral de las células ductulares pancreáticas,³²⁷ estos canales también se han localizado recientemente en la membrana apical de las células de conductos de cobaya.³⁶⁰ Estos canales apicales de K^+ , regulados por Ca^{2+} , podrían jugar un papel importante en la regulación de la secreción de HCO_3^- a través de cambios en el potencial de membrana de las células ductulares.³⁶⁰

El efecto del bloqueo de los canales de K^+ sobre la secreción electrolítica en el páncreas no está claro. Por un lado, parece que el bloqueo de estos canales en el páncreas perfundido de rata no afecta a la secreción;⁸⁷ sin embargo, el bloqueo de los canales de K^+ en experimentos con conductos aislados de la misma especie produce una inhibición de la respuesta secretora a secretina.¹⁸ Recientemente, Venglovecz *et al.*³⁶⁰ han observado que el bloqueo selectivo, con iberitoxina, de los canales maxi- K^+ apicales no modifica la respuesta secretora a secretina, carbacol o ATP en conductos pancreáticos de cobaya.

Intercambiador aniónico (AE)

Estudios de microperfusión realizados con conductos de rata mostraron la existencia de un intercambiador aniónico, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, en la membrana basolateral, además de en la luminal, de las células ductulares.³⁸⁶

La medida de pH intracelular en conductos pancreáticos de cobaya demuestra que, tras la adición de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ al medio de perfusión basolateral, se produce una rápida acidificación,

seguida de una alcalinización de la célula ductular. El CO_2 difunde a través de la membrana y origina H^+ y HCO_3^- a través de la reacción catalizada por la anhidrasa carbónica; si el HCO_3^- sale de la célula se acumulan momentáneamente los H^+ , dando lugar a una acidificación previa a una alcalinización, en gran parte dependiente de la presencia de Cl^- en el lado basolateral.¹⁵⁸ La salida del HCO_3^- se produce por la actividad del intercambiador aniónico basolateral.³⁸⁶ Los autores de este estudio sugieren la reversibilidad de este intercambiador, ya que la alcalinización resultante de la adición de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ basolateral fue mayor en ausencia de Cl^- que en su presencia. También defienden una mayor actividad del intercambiador basolateral que del luminal en conductos no estimulados.

Experimentos de perfusión del conducto pancreático principal de ratón han demostrado la actividad de un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, que se puede bloquear con DIDS, en ambas membranas ductulares, poniendo de manifiesto en este caso una mayor actividad del intercambiador luminal que del basolateral, tanto en conductos estimulados como sin estimular.²⁰⁵ El intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ basolateral no parece aumentar su actividad en respuesta a forskolina.²⁰⁵

Aunque no se conoce cuál es el intercambiador aniónico presente en la membrana basolateral de las células ductulares pancreáticas, algunos autores sugieren que es el AE2, un miembro de la familia de intercambiadores aniónicos SLC4.²⁷⁷ El papel que pueda tener este intercambiador en la membrana basolateral no está claro; asumiendo que actúa como un intercambiador electroneutro, dispararía la acumulación de HCO_3^- intracelular, y favorecería la entrada de Cl^- a través de la membrana basolateral, proporcionando una fuerza conductora mayor para la secreción de Cl^- . Esta hipótesis se apoya en algunos trabajos llevados a cabo con conductos interlobulares de rata.¹⁸

H⁺,K⁺-ATPasa

Las H^+, K^+ -ATPasas pertenecen a la familia de las ATPasas de tipo P. En un estudio muy reciente, Novak *et al.*²⁴⁴ han localizado, mediante inmunofluorescencia, tanto la H^+, K^+ -ATPasa gástrica como la no gástrica en la membrana lateral y apical de las células de los conductos pancreáticos intercalares, intralobulares e interlobulares de rata.

La bomba gástrica es capaz de generar grandes gradientes de H^+ y su función fisiológica en las células parietales del estómago es mediar la secreción de HCl .^{137,220,381} En el riñón, esta bomba es la responsable de la secreción de H^+ y de la reabsorción y recirculación de K^+ .^{308,313} Las bombas no gástricas se expresan en muchos tejidos, como colon, riñón, placenta, piel o próstata, en los que contribuyen a la secreción de H^+ y reabsorción de K^+ ; su funcionamiento suele estar asociado a situaciones no fisiológicas, como los desajustes en el equilibrio ácido-base o en la homeostasis del K^+ y del Na^+ .^{165,258,313}

Experimentos de medida de la recuperación del pH_i tras una carga ácida parecen indicar que las H^+,K^+ -ATPasas contribuirían de forma significativa a la secreción de HCO_3^- estimulada por secretina en conductos pancreáticos de pequeño tamaño de rata.²⁴⁴ Además, parece que la inhibición de esta bomba, con omeprazol o con $SCH-28080$,²⁴⁴ provoca una disminución de la secreción ductular mucho mayor que la observada al inhibir cualquier otro tipo de transportador, como el NHE , NBC o AE .^{91,156} Aunque, como ya se ha mencionado, las técnicas inmunohistoquímicas localizan estas proteínas transportadoras tanto en la membrana lateral como en la luminal, los propios autores de este estudio ponen en duda la funcionalidad de las H^+,K^+ -ATPasas lumbales.²⁴⁴

1.2.3. Transporte de iones a través de la membrana apical

Siguiendo la hipótesis clásica, la secreción de HCO_3^- a través de la membrana luminal se realiza, fundamentalmente, por medio de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- , acoplado a un canal de Cl^- , identificado como el $CFTR$, el regulador transmembranal de la fibrosis quística.

Intercambiadores aniónicos

Algunos trabajos demostraron que la secreción pancreática de HCO_3^- depende de la presencia de Cl^- en el lumen ductular, y que la sustitución del Cl^- por un anión que no puede atravesar la membrana plasmática es capaz de inhibir, hasta un 60%, la secreción de los conductos pancreáticos en distintas especies.^{18,44,195} Estos resultados sugieren que la secreción de HCO_3^- en las células ductulares pancreáticas estaría mediada por un intercambiador aniónico Cl^-/HCO_3^- , localizado en la membrana luminal. La existencia de este intercambiador se

demonstró en conductos interlobulares de rata³³¹ y posteriormente se comprobó que su actividad aumenta cuando se estimula la secreción de HCO_3^- en cobaya y ratón.^{204,327}

La identificación molecular del intercambiador aniónico de la membrana apical de las células ductulares ha sido un campo de investigación muy activo en los últimos años. Finalmente, se ha demostrado que este intercambiador es un miembro de la familia SLC26,^{80,246} concretamente el SLC26A6, también llamado CFEX o PAT1, aunque también se expresa en menor medida el SLC26A3 o DRA, que se detectó por primera vez en conductos pancreáticos de ratón.¹¹⁸ La expresión del SLC26A6 se ha demostrado en conductos pancreáticos de ratón,¹⁶⁰ de cobaya,³³⁰ en el páncreas humano y en dos líneas celulares ductulares pancreáticas humanas.²¹⁵

La expresión de los dos intercambiadores puede ser diferente a lo largo del árbol ductal: el SLC26A6 se expresaría en las zonas más proximales, mientras que el SLC26A3 se localizaría en las zonas más distales. Esto explicaría la secreción de HCO_3^- en las partes proximales y su intercambio por Cl^- en las distales.^{186,188}

Los diez miembros de la familia SLC26 codifican para intercambiadores aniónicos, capaces de transportar un amplio rango de aniones, mono y divalentes, como formiato, oxalato, SO_4^{2-} , Cl^- , HCO_3^- y OH^- . Sus estequiometrías varían, algunos son electrogénicos y varios de ellos muestran una fuerte interacción con CFTR.⁸⁴

Estudios funcionales³⁰⁷ o de delección del gen *slc26a6* en ratones¹⁶⁰ demuestran una actividad electrogénica para SLC26A3 y SLC26A6, aunque la polaridad de ambos intercambiadores es opuesta: el SLC26A3 presenta una estequiometría $2\text{Cl}^-:1\text{HCO}_3^-$ o mayor, mientras que la del SLC26A6 es $1\text{Cl}^-:2\text{HCO}_3^-$ o menor. Por otro lado, la homología entre el SLC26A6 de ratón y el humano es solo del 78%; estudios recientes, que analizan el intercambio de oxalato/ Cl^- a través de este transportador, muestran diferencias entre ambas especies tanto en su estequiometría como en su afinidad por el Cl^- .⁶²

En células ductulares de cobaya parece que la estequiometría del SLC26A6 es $1\text{Cl}^-:2\text{HCO}_3^-$, lo que implica que este intercambiador aniónico debería ser capaz de mantener por sí solo una secreción neta de fluido; de hecho, cuando se bloqueaba el CFTR con CFTR_{inh}-172, se mantenía una secreción rica en HCO_3^- .³²⁹ Sin embargo, siguen existiendo dudas acerca de la

estequiometría exacta del intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ a través del SLC26A6 en humanos y en otras especies.²⁴⁷

CFTR

Mediante estudios de *patch-clamp* se demostró la existencia, en conductos interlobulares de rata, de canales aniónicos que son activados tras la estimulación con secretina y cAMP.^{110,241} También se encontraron estos canales de Cl^- en células ductulares pancreáticas de otras especies,^{9,115,236,250} incluido el hombre.^{24,111} Estos canales aniónicos son los denominados CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*), proteína codificada por el gen de la fibrosis quística, y son activados por la vía del cAMP/PKA.^{11,275}

El CFTR comparte estructura con la familia de proteínas *ATP-binding cassette* (ABC), que, hidrolizando ATP, obtienen energía para transportar compuestos a través de la membrana celular en contra de gradiente químico. El CFTR presenta 12 segmentos transmembrana dispuestos en dos dominios de 6 segmentos cada uno (TMD₁ y TMD₂), 2 dominios citoplasmáticos de unión a nucleótidos (NBD₁ y NBD₂) y un dominio regulador (R) con múltiples sitios de fosforilación para la PKA y para la proteína cinasa C (PKC).²⁷⁵

El CFTR, a diferencia de otros transportadores de la familia ABC, no requiere la hidrólisis del ATP para transportar los aniones, ya que funciona como un canal en el que estos fluyen a favor de gradiente electroquímico.²⁶⁸ Sin embargo, parece que la hidrólisis de ATP puede aumentar la eficacia del transporte, haciendo más estable el estado abierto del canal o bien aportando mayor reversibilidad.⁷ Se piensa, pues, que la hidrólisis del ATP tiene un papel regulador de la apertura y cierre del canal.¹⁴⁸

Medidas de la conductancia del Cl^- por *patch-clamp* en células de conductos intra- e interlobulares de cobaya demostraron que a la concentración máxima de HCO_3^- luminal en esta especie (150 mM),^{46,250} las corrientes de Cl^- a través de los canales CFTR de la membrana luminal se inhiben. Los autores proponen que la inhibición de la salida de Cl^- podría limitar la despolarización de la membrana luminal y mantener la fuerza eléctrica para la salida de HCO_3^- a través de la fracción de CFTR no inhibida. El CFTR es 3-5 veces más selectivo para Cl^- que para HCO_3^- ;^{24,116,151} sin embargo, es posible que esta selectividad sea variable y esté regulada

por señales intracelulares.²⁷⁰ En estudios de expresión de CFTR en oocitos de *Xenopus* se demostró que, cuando el Cl^- extracelular cae a bajas concentraciones, como ocurre cuando se produce una secreción máxima en los conductos pancreáticos, la permeabilidad del CFTR al HCO_3^- se incrementa.³⁰⁶ En conductos pancreáticos aislados de cobaya se demostró que, tras la estimulación en condiciones fisiológicas, la concentración de Cl^- intracelular es muy baja, por lo que se ve favorecido el transporte de HCO_3^- a través del CFTR, mecanismo que podría contribuir a que se alcancen las elevadas concentraciones de HCO_3^- que caracterizan a su jugo pancreático.¹⁵⁹ Un trabajo reciente en conductos pancreáticos de esta especie apoyaría esta última hipótesis, al concluir que una fracción significativa del HCO_3^- secretado hacia el lumen atraviesa la membrana apical a través del CFTR.¹⁶¹ Sin embargo, un reciente y meticuloso estudio de *patch-clamp* con células humanas³⁴¹ pone en duda que la permeabilidad del CFTR al HCO_3^- aumente cuando la concentración de Cl^- extracelular es baja, como ocurre en el lumen ductular.³⁰⁶ Según este trabajo, parece que la ratio de permeabilidad del CFTR ($P_{\text{HCO}_3^-}:P_{\text{Cl}^-}$) está fijada aproximadamente en 0.25, independientemente de la concentración de Cl^- extracelular y de mutaciones que afecten a la conductancia del Cl^- y a la secreción de HCO_3^- .³⁴¹

El CFTR regula, al menos en parte, los mecanismos de secreción de HCO_3^- de las células ductulares. Las mutaciones del gen *cftr* causan una enfermedad hereditaria, denominada fibrosis quística.¹⁷⁸ Las personas afectadas por esta patología presentan una secreción de HCO_3^- reducida,^{104,192} lo que produce una acidificación del jugo pancreático, y con ella una precipitación de las mucinas y formación de quistes. Además, se produce una activación prematura de las enzimas pancreáticas digestivas, lo que conlleva una fibrosis generalizada de la glándula.⁸² El grave efecto de esta patología en el páncreas pone en evidencia el importante papel que juega el CFTR en la secreción ductular pancreática.

Canales de Cl^- activados por Ca^{2+} (CACC)

La secreción de Cl^- a través de la membrana luminal de células ductulares pancreáticas no solo se produce a través del canal CFTR, sino también a través de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} (CACC).¹⁷⁹

La presencia de canales CACC se ha descrito en células ductulares de varias especies; la densidad de la corriente a través de estos canales es mayor en conductos pancreáticos de ratón y humanos que en los de rata o cobaya.¹¹⁷ Se ha sugerido que, en esas dos especies, los CACC desempeñan un importante papel en la función ductular, ya que diversos agonistas cuya acción cursa por la vía del Ca^{2+} , como acetilcolina,¹⁹ ATP luminal¹⁵⁷ o el propio Ca^{2+} extracelular,³² tienen un efecto activador de la secreción. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que agonistas colinérgicos, como el carbacol, así como el ATP, pueden activar los CACC en células CFPAC-1, carentes de CFTR.³⁶⁷ Además, los CACC median la secreción aniónica inducida por ATP y angiotensina-II.^{50,51} Por último, existen pruebas de que los canales de Cl^- activados por Ca^{2+} pueden mantener la secreción de HCO_3^- en células CFPAC-1, ya sea actuando como canales de HCO_3^- en sí mismos, o ejerciendo su acción a través de un intercambiador aniónico apical.³⁸⁷

La actividad de estos canales se ha puesto de manifiesto, mediante estudios de *patch-clamp*, en la membrana apical de células ductulares de ratón.¹¹⁵ En esta especie, la activación de los canales CFTR por cAMP es relativamente baja, mientras que la ionomicina, que produce un aumento importante de la concentración de Ca^{2+} citosólico, aumenta de forma muy marcada la conductancia al Cl^- , tanto en células ductulares de ratones normales como de ratones con fibrosis quística.^{115,375} Se ha postulado que la presencia de CACC podría explicar el poco daño que sufre el páncreas en modelos experimentales de ratones con fibrosis quística, puesto que este canal podría funcionar como un sustituto del CFTR;³⁸⁷ sin embargo, no se ha encontrado un incremento de la actividad de estos canales en ratones *knockout* para CFTR.³⁷⁵ Además, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la secreción inducida por forskolina en conductos pancreáticos de ratones *knockout* para CFTR no está mediada por la actividad de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} .²⁵⁶

Este tipo de canales aún no se han identificado molecularmente, aunque se ha propuesto que podrían pertenecer a la familia de las bestrofinas, por su dependencia del Ca^{2+} , su conductancia al Cl^- y su distribución en los tejidos.¹²⁸ Sin embargo, un estudio reciente en distintos tejidos epiteliales de ratón relaciona estos canales con la familia de las anoctamidas, formada por diez proteínas (ANO1-ANO10),²⁹⁸ que producen corrientes de Cl^- y presentan una sensibilidad variable al Ca^{2+} y distinto tiempo de activación. Se ha descrito que en ratones

knockout para ANO1 aparecen alteraciones en el transporte epitelial de electrolitos, que acaban provocando una patología similar a la fibrosis quística.²⁹⁸

1.2.4. Transporte transepitelial de H₂O: acuaporinas

La mayor parte del fluido secretado por el páncreas lo generan las células ductulares, que constituyen solo una pequeña fracción de la glándula. El jugo pancreático es isotónico respecto al plasma, por lo que siempre se ha pensado en un movimiento osmótico de H₂O acompañando al transporte activo de los electrolitos; se suponía que este transporte de agua seguía la ruta paracelular,¹⁶⁶ hasta el descubrimiento de las acuaporinas (AQP), unas pequeñas proteínas que forman canales y proporcionan una vía para el movimiento de H₂O a través de las membranas celulares en una gran variedad de tejidos.²⁶⁴ Hasta la fecha se han identificado trece proteínas distintas de esta familia en tejidos de mamíferos (AQP0-AQP12).¹⁵³

En el páncreas humano, la secreción de fluido tiene lugar principalmente en los conductos intercalares, en los que las células epiteliales expresan la AQP1 y la AQP5 en la membrana apical y la AQP1 en la basolateral;³⁶ la AQP1 también aparece en los conductos intralobulares, pero en menor medida. En la rata y el ratón, la secreción de fluido se produce principalmente en los conductos interlobulares, donde la expresión de las acuaporinas es similar a la del páncreas humano: la AQP1 y la AQP5 se encuentran en la membrana apical y solo la AQP1 en la basolateral, si bien en la rata y el ratón la inmunorreactividad para estas proteínas es mucho más débil que en humanos;³⁶ esto no resulta sorprendente, teniendo en cuenta la gran diferencia en la secreción total de H₂O en el jugo pancreático humano y en el de esas especies de roedores.⁴⁷

En conductos interlobulares aislados de rata se ha demostrado que el bloqueo de la AQP1 basolateral con Hg²⁺ inhibe, aunque solo parcialmente, los cambios de volumen luminal inducidos por soluciones de perfusión de diferente osmolaridad.³⁶ Estos resultados sugieren que el movimiento transepitelial de fluido en los conductos pancreáticos de esta especie ocurre tanto por la vía paracelular como por la transcelular.

1.2.5. Modelo actualizado

A la vista de todo lo revisado anteriormente, se representa a continuación un modelo actualizado de los mecanismos de transporte epitelial en una célula de un conducto interlobular del páncreas de la rata.

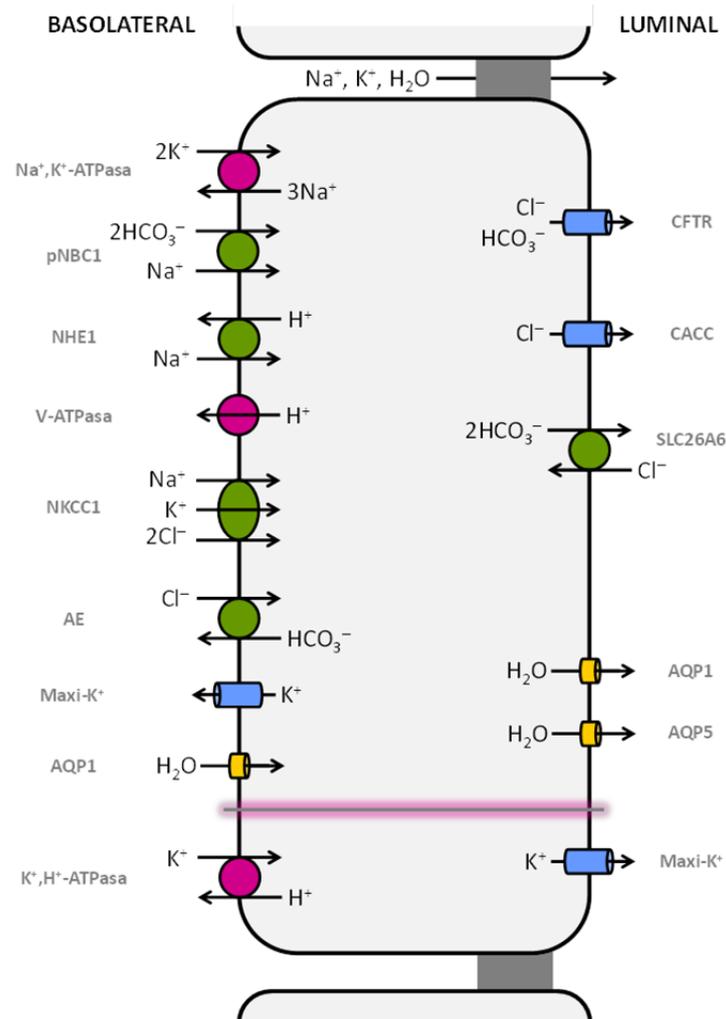


Figura 2: Mecanismos de transporte de H₂O y electrolitos en una célula de un conducto interlobular del páncreas de la rata. Se representan, en la membrana basolateral, la Na⁺,K⁺-ATPasa, el cotransportador Na⁺-2HCO₃⁻ (pNBC1), el intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE1), la H⁺-ATPasa vacuolar (V-ATPasa), el cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC1), el intercambiador aniónico Cl⁻/HCO₃⁻ (AE), los canales de K⁺ de elevada conductancia (maxi-K⁺) y la acuaporina 1 (AQP1). En la membrana luminal se representan el canal aniónico CFTR, los canales de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺ (CACC), el intercambiador 2HCO₃⁻/Cl⁻ (SLC26A6), y las acuaporinas 1 y 5 (AQP1 y AQP5). En la parte inferior del modelo se representan, separadas por una línea, la H⁺,K⁺-ATPasa basolateral y los maxi-K⁺ luminales; estos mecanismos se han descrito muy recientemente y su importancia real está pendiente de confirmación. En este modelo no se representan mecanismos como el intercambiador HCO₃⁻/2Cl⁻ luminal (SLC26A3) o el intercambiador Na⁺/H⁺ luminal (NHE3), cuya expresión, en la rata, parece restringida a conductos de mayor calibre.

1.3. Regulación de los mecanismos de secreción ductular

1.3.1. Vía del cAMP-PKA (Secretina)

El péptido más estudiado y con seguridad el más importante en la regulación de la secreción pancreática de HCO_3^- es la hormona secretina.⁴⁶ Estudios en conductos pancreáticos aislados demuestran que la secretina ejerce su efecto sobre las células ductulares a través del aumento en la concentración intracelular de cAMP,¹⁴ que activa al CFTR de la membrana luminal,¹¹¹ desencadenando la secreción ductular de HCO_3^- al generar un gradiente favorable para el funcionamiento del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ luminal.^{114,323}

Los receptores de la secretina, que están presentes en las células acinares y ductulares del páncreas,³⁵¹ pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G,³⁵⁰ tras su ocupación por el agonista, activan a la adenilil ciclasa, de forma que aumenta la síntesis de cAMP.^{12,61,92} La PKA tiene un papel esencial en la señalización intracelular, como efector del incremento del cAMP, como se ha demostrado en una línea celular transfectada con el receptor de secretina.²³⁵ En estas mismas células se ha comprobado que la forskolina, un activador de la adenilil ciclasa,³⁰¹ provoca la misma respuesta a través del aumento de cAMP.²³⁵ La forskolina ha sido muy utilizada como secretagogo en los estudios de secreción ductular, en los que reproduce el efecto causado por la secretina y/o el péptido intestinal vasoactivo (VIP).^{89,110,155,159,254,287,326,385}

El CFTR presenta múltiples sitios de fosforilación para la PKA y para la PKC.²⁷⁵ La PKA activa al CFTR al fosforilarlo,^{99,110} mientras que la PKC modula este proceso.⁵³ La activación del CFTR tiene importantes consecuencias eléctricas en la célula ductular, ya que provoca una importante disminución de la resistencia eléctrica de la membrana apical, así como una marcada despolarización de ambas membranas, luminal y basolateral.^{46,240,242}

Se ha descrito que la PKA también fosforila a los maxi-canales de K^+ ;¹¹³ esta fosforilación incrementa la sensibilidad del canal al Ca^{2+} intracelular, de forma que se activa, permitiendo un mecanismo de salida de cationes que equilibra la fuerza electrogénica provocada por la salida de HCO_3^- a través de la membrana luminal.⁴⁶

Por tanto, el modelo clásico de secreción de electrolitos en las células ductulares pancreáticas postula que la PKA está implicada en la activación de los mecanismos de transporte epitelial, mediante la fosforilación, y consiguiente activación, tanto del CFTR como de los canales maxi-K⁺.^{110,113} Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la inhibición de la PKA no bloquea por completo la respuesta secretora a forskolina en conductos pancreáticos de ratón, tanto en lo referente a la secreción de Cl⁻ como a la secreción dependiente de HCO₃⁻.¹³⁹

En este sentido, se ha descubierto la existencia de una vía de actuación del cAMP, independiente de la PKA, y mediada por la activación de proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina de la proteína G monomérica Rap1, las Epac, proteínas de las que existen al menos dos isoformas, Epac1 y Epac2.⁷⁶ Epac1 se expresa en el páncreas.⁷⁶ Las proteínas Epac regulan la función de canales iónicos en diversos tipos celulares; así, se ha descrito que las Epac pueden inhibir los canales de K⁺ sensibles a ATP en células β pancreáticas,¹⁷³ incrementar la corriente de Ca²⁺ a través de canales de tipo T, activados por bajo voltaje, en células cromafines,²⁴⁵ aumentar la probabilidad de apertura de canales de Na⁺ sensibles a amilorida en células epiteliales,¹³⁸ o activar una corriente aniónica, con características similares a la mediada por los canales de Cl⁻ dependientes de volumen, en hepatocitos.¹⁵ También se ha descrito que la activación de Epac produce incrementos en la concentración de Ca²⁺ citosólico en células del conducto colector renal, lo que sugiere que estas proteínas podrían estar implicadas en la regulación del transporte de Cl⁻ a través de los CACC.³⁸²

Hasta el momento, existen pocos estudios sobre el eventual papel de las Epac en el páncreas exocrino, y todos ellos se han centrado en la fisiología de las células acinares.^{304,374} Se ha demostrado que el cAMP tiene dos mecanismos efectores intracelulares en estas células: la tradicional vía de la PKA y la ruta iniciada por Epac.⁵⁵ Los agonistas específicos de Epac no provocan ninguna respuesta secretora en acinos aislados de rata, pero sí que potencian la respuesta secretora tras la estimulación con concentraciones fisiológicas de secretagogos que actúan a través de la vía del Ca²⁺, como el carbacol (un agonista colinérgico) o la ceruleína (un análogo de la CCK).⁵⁵ Además, los agonistas de Epac también potencian la activación prematura de proenzimas pancreáticas inducida por concentraciones suprafisiológicas de carbacol o de

ceruleína.⁵⁵ Por otro lado, en estudios con acinos pancreáticos de ratón, se ha observado que la liberación de amilasas estimulada por cAMP parece ser independiente de PKA y dependiente de Epac1, cuyo efecto no requiere la movilización de Ca^{2+} .²⁸³ Además, se ha comprobado que, en este tipo celular, Epac1 provoca la activación de Rap1, acontecimiento que parece ser suficiente para inducir la secreción de enzimas pancreáticas,²⁸³ ya que el efecto estimulante de la CCK o el carbacol sobre la secreción en acinos pancreáticos de ratón se inhibe de forma significativa si se bloquea la activación de Rap1.²⁸³

1.3.2. Vía del Ca^{2+} (Acetilcolina)

El cAMP fue considerado durante mucho tiempo el único mensajero intracelular desencadenante de la secreción ductular pancreática. Aunque se sabía que la estimulación colinérgica inducía un aumento en la secreción pancreática, tanto de enzimas como de fluido, se pensaba que la estimulación parasimpática del páncreas afectaba solo a los acinos. En estudios con páncreas de ratas sometidas a una dieta carente en cobre, que atrofia sus acinos,^{12,14} se comprobó que la acetilcolina es también un poderoso estimulante de la secreción de fluido ductular.^{19,89} Este agonista actúa a través de receptores muscarínicos, aumentando la concentración de Ca^{2+} citosólico libre en las células ductulares.³³² Se ha comprobado que el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ en conductos pancreáticos, tras su tratamiento con un ionóforo del Ca^{2+} , la ionomicina, provoca una estimulación de la secreción de electrolitos.¹⁹ Esta secreción de HCO_3^- estimulada por Ca^{2+} en células ductulares podría estar mediada por los CACC, junto con el CFTR y el intercambio HCO_3^-/Cl^- a través de la membrana luminal.²³¹

Se sabe que la histamina,²³⁷ la angiotensina II,⁵¹ la tripsina,^{50,157,231} el propio Ca^{2+} extracelular,³² el ATP y el UTP,^{17,18,149,213,252,337} la bombesina²³¹ y la CCK,^{213,337} también son capaces de estimular la secreción ductular en el páncreas de diversas especies, a través de un incremento del Ca^{2+} intracelular.

En contraste, la sustancia P provoca una disminución de la secreción basal de los conductos pancreáticos de rata e inhibe la secreción estimulada por bombesina, péptido cuyas acciones cursan a través de la ruta del Ca^{2+} .^{17,134}

1.3.3. Activación de la secreción por cGMP

Se ha descrito que la guanilina y la uroguanilina tienen un papel regulador en la secreción pancreática de HCO_3^- . Primero se comprobó que estos péptidos activaban el CFTR a través de un incremento en la concentración de cGMP, estimulando la secreción de agua y electrolitos en el epitelio intestinal.^{67,168} Ambas proteínas, junto con su receptor con actividad guanilil ciclasa C^{100} se han localizado, mediante inmunohistoquímica, en los dominios apicales de las células centroacinares y ductulares del páncreas exocrino de rata¹⁹⁶ y humano.^{196,197} También se ha demostrado la expresión en células ductulares del páncreas humano de una proteína intermediaria, la proteína cinasa dependiente de cGMP (cGKII)¹⁹⁷ que, una vez activada como consecuencia del aumento de cGMP, fosforila al CFTR, activándolo y provocando la consiguiente estimulación de la secreción ductular.¹⁹⁷

1.3.4. Relaciones entre transportadores

Además de actuar como un canal aniónico, el CFTR tiene múltiples funciones de regulación de otras proteínas transportadoras. Se ha comprobado, tanto en estudios de expresión en líneas celulares humanas,²⁰⁵ como en el conducto pancreático principal del ratón,²⁰⁴ que la activación del CFTR estimula al intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ luminal. También se ha descrito que, en el conducto pancreático principal de ratón, el CFTR activado inhibe al NHE3 luminal, responsable de la salida de H^+ al lumen y de la entrada de Na^+ en la célula ductular,⁴ favoreciendo por ambos mecanismos la secreción de HCO_3^- . En las líneas celulares humanas CAPAN-1 y CFPAC-1, la presencia del CFTR parece necesaria para que el cAMP active el transporte de HCO_3^- a través del pNBC1 basolateral.³¹¹ Esto se puso de relieve tras la transfección de células CFPAC-1, que carecen de CFTR funcional, con *cftr* no mutado; los autores de este estudio han sugerido que la despolarización de la membrana, consecuencia de la salida de Cl^- a través del CFTR, es la causa de la activación del transporte electrogénico mediado por el pNBC1.³¹¹ También se ha descrito que la transfección con el gen *cftr*, en la línea CFPAC-1, influye en la activación mediada por cAMP de los canales de K^+ basolaterales,²¹⁷ y regula la expresión y actividad del cotransportador NKCC1.³¹²

Una vez identificada la naturaleza molecular de los intercambiadores aniónicos luminales, se ha podido observar que el CFTR interviene en la activación del intercambio mediado tanto por

SLC26A3 como por SLC26A6.¹⁸⁶ Se ha sugerido que el dominio regulador del CFTR puede interactuar con un dominio STAS (*sulfate transporter and antisigma antagonist*), altamente conservado, de varios transportadores de la familia SLC26; esta unión tiene como resultado la activación recíproca de ambos transportadores.¹⁸⁸

Muchas de estas interacciones con otras proteínas tienen lugar dentro de complejos macromoleculares, en los que intervienen proteínas ensambladoras con dominios PDZ; estos dominios proporcionan puntos de anclaje a los motivos de unión a PDZ del extremo C-terminal de muchas proteínas de membrana.²⁰⁷ La asociación física entre intercambiadores de la familia SLC26 y CFTR es posible, ya que se ha demostrado la presencia de un dominio PDZ en el extremo C-terminal del SLC26A6, idéntico al que presenta el CFTR.²¹⁶ Tanto el SLC26A6 como el CFTR se unen a través de motivos PDZ a las proteínas ensambladoras EBP50 (NHERF1, *Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 1*) y E3KARP. Es posible que las interacciones dentro del complejo CFTR-EBP50-SLC26A6 sean responsables de la estimulación del intercambio apical de aniones mediado por la activación del CFTR.²⁰⁴ Las interacciones entre el CFTR y el SLC26A6 pueden consistir en una activación mutua, cuando el CFTR ha sido fosforilado por la PKA,¹⁸⁸ o en una supresión de la actividad del CFTR como canal aniónico, por el SLC26A6, en condiciones de reposo.⁸⁰ Aunque muy pocos trabajos se han centrado específicamente en las células ductulares pancreáticas, estudios de expresión heteróloga han revelado cómo las proteínas de ensamblaje EBP50 y Shank2 provocan la proximidad física entre la PKA y algunas fosfodiesterasas, por una parte, y el CFTR por otra y, de este modo, incrementan o reducen la probabilidad de la activación del CFTR dependiente de cAMP.²⁰³ El AMP generado por las fosfodiesterasas, dentro del complejo macromolecular, puede a su vez ejercer un efecto inhibitor sobre el CFTR, a través de la AMPK (cinasa dependiente de AMP), que probablemente forma parte de este complejo.¹⁹⁰ Estudios en duodeno de ratones *knockout* para la familia de las proteínas de ensamblaje NHERF, demostraron que los β_2 -adrenoreceptores y los receptores del ácido lisofosfatídico ejercen su influencia sobre el CFTR y sobre la secreción de HCO_3^- a través de miembros específicos de esta familia de proteínas.³¹⁵

En los últimos años está cobrando importancia una proteína descubierta recientemente, denominada IRBIT (*IP₃R₅ binding protein released with IP₃*), por su papel en la regulación de la secreción ductular de fluido y HCO_3^- .³⁷⁹ Se ha observado que IRBIT posee múltiples

funciones y regula la actividad de diversas proteínas, incluyendo transportadores de HCO_3^- , lo que la convierte en un elemento esencial para la coordinación de los mecanismos de secreción epitelial de este anión.³⁷⁹ Se ha demostrado que el cotransportador pNBC1 posee un único dominio N-terminal que interactúa con IRBIT;³¹⁰ cuando el cotransportador se expresa en oocitos de *Xenopus* su actividad basal es baja, si bien la coexpresión de IRBIT la incrementa marcadamente.³¹⁰ Además, en ratones *knockdown* para IRBIT la secreción pancreática ductular de fluido y HCO_3^- se reduce, bien por la inhibición del pNBC1 o por la de otros transportadores luminales de HCO_3^- ;³⁷⁸ de hecho, se ha descrito, en estos mismos ratones, que el CFTR también se activa por IRBIT, aunque la interacción entre ambos es distinta a la que tiene lugar entre IRBIT y pNBC1.³⁷⁸ Así, parece que la activación por IRBIT, tanto del pNBC1 como del CFTR, acopla la entrada basolateral de HCO_3^- con su salida por la membrana luminal, asegurando así la coordinación de la secreción ductular de fluido y HCO_3^- .³⁷⁹

Otro de los mecanismos de transporte activado por IRBIT es el intercambiador luminal Na^+/H^+ , el NHE3.¹³¹ En condiciones de bajas tasas de secreción, el NHE3 puede recuperar HCO_3^- del jugo pancreático: los H^+ secretados al lumen reaccionan con el HCO_3^- , generando CO_2 , que difunde al interior de la célula, donde originará HCO_3^- . Se ha descrito que el CFTR inhibe la actividad del NHE3 en conductos estimulados.⁴ A la vista de estos resultados, se ha postulado que IRBIT coordina la recuperación de HCO_3^- en el estado de reposo y la secreción de HCO_3^- tras su estimulación.³⁷⁹

2. FRACCIÓN ACINAR DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA EXOCRINA

2.1. Estructura del acino pancreático

El acino pancreático está constituido por una capa de células de origen epitelial, con forma piramidal, que presentan un polo apical, con microvellosidades orientadas hacia la luz acinar, y una zona basal que se apoya en una membrana de tejido conectivo. El acino está formado principalmente por células acinares, aunque también contiene células centroacinares.²⁷

- **Células acinares:** Están especializadas en la secreción enzimática, presentando un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado, localizado en su porción basal, y un elevado número de mitocondrias.¹⁰⁷ Tienen un citoplasma muy basófilo y una gran cantidad de gránulos de zimógeno acidófilos, localizados principalmente en la zona apical de la célula.¹⁰⁷ El tamaño de los gránulos de zimógeno varía según su grado de desarrollo y en respuesta a la estimulación por agentes neurohormonales.¹⁰⁷

Las enzimas sintetizadas en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso se transportan mediante un sistema de cisternas hasta el aparato de Golgi, y de allí en vacuolas condensantes, que madurarán hasta gránulos de zimógeno, donde estas proteínas se almacenan hasta ser secretadas. Este mecanismo permite que las enzimas estén en todo momento en compartimentos aislados del citoplasma.

Las células acinares adyacentes se unen mediante complejos que incluyen zonas de adherencia, desmosomas, *tight junctions* y *gap junctions*. Estas uniones se localizan en las proximidades de la región apical y permiten la coordinación de la función de células vecinas.

En la membrana basolateral de las células acinares se localizan los receptores para hormonas y neurotransmisores, como la colecistocinina (CCK), secretina, péptido liberador de gastrina (GRP), acetilcolina, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), responsables todos ellos de estimular la síntesis y secreción enzimática por parte de la célula.

- **Células centroacinares:** marcan el inicio del sistema ductular y contribuyen a la secreción de fluido y electrolitos. Son de menor tamaño que las células acinares y su citoplasma carece de gránulos de zimógeno, presentando un retículo endoplasmático rugoso poco abundante.¹⁰⁷ Se ha demostrado en la especie humana que estas células, al igual que las ductulares, presentan actividad anhidrasa carbónica.³²⁴

2.2. Fisiología de las células acinares

2.2.1. Generalidades

La principal función de las células acinares es sintetizar, almacenar y secretar una gran variedad de enzimas digestivas, junto con un pequeño volumen de jugo pancreático, rico en NaCl. Las enzimas pancreáticas son de distintos tipos: glicolíticas, lipolíticas, proteolíticas y nucleolíticas, responsables de la hidrólisis de glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, respectivamente, de forma que actúan sobre estos componentes de los alimentos para producir moléculas que puedan ser absorbidas por la mucosa intestinal. La proporción relativa de estos tipos de enzimas varía sustancialmente entre las distintas especies, en función sobre todo de la composición de su dieta. Muchas de las enzimas se sintetizan y secretan como precursores inactivos, lo que evita la autodigestión del propio páncreas; además, el jugo pancreático contiene algunos inhibidores enzimáticos, que contrarrestan la eventual activación prematura de las enzimas. De este modo, en condiciones fisiológicas normales, las enzimas digestivas se activan solo cuando llegan al duodeno.

2.2.2. Regulación de la secreción

La ingestión de comida inicia una serie de mecanismos nerviosos, endocrinos y paracrinos que regulan la liberación de cantidades adecuadas de enzimas digestivas desde las células acinares. Existen varios reguladores nerviosos o humorales que se liberan en respuesta a la ingestión de comida, como la CCK, la acetilcolina, la secretina o el VIP. Otros muchos péptidos gastrointestinales también pueden actuar como secretagogos, aunque su relevancia fisiológica no está tan clara. Existen además otra serie de agentes que actúan como moduladores de la secreción y que son, entre otros, la insulina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la somatostatina o la sustancia P.

Los secretagogos pancreáticos estimulan la secreción acinar, pero también pueden afectar a otras funciones, como la síntesis de proteínas, la expresión genética, el crecimiento y la producción de energía.³⁷³ La acción de los secretagogos sobre la secreción enzimática se inicia tras su unión reversible al dominio extracelular de su receptor, localizado en la membrana basolateral de la célula acinar. La unión del secretagogo a su receptor es necesaria y

suficiente para iniciar varias vías de transducción de señales, en las que intervienen diversos mensajeros intracelulares, que culminan en la fusión directa de los gránulos de zimógeno con la membrana plasmática luminal, estimulando por tanto la secreción enzimática del páncreas.

De acuerdo con el tipo de receptor, clásicamente se han identificado dos mecanismos de señalización intracelular que median las acciones de los diferentes secretagogos sobre la secreción enzimática del páncreas: uno utiliza oscilaciones de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico libre ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) y el otro incrementos del cAMP. El primero implica la activación de la fosfolipasa C, mientras que el segundo requiere la estimulación de la adenilil ciclasa; ambos fenómenos se producen por interacción del secretagogo con receptores de membrana acoplados a proteínas G.

La mayoría de los trabajos sobre mecanismos de señalización intracelular se han centrado en algunos secretagogos pancreáticos, como CCK, acetilcolina, secretina y VIP. Los dos primeros activan la vía de señalización del inositol trisfosfato (IP_3)/diacilglicerol, que aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y activa a la proteína cinasa C (PKC). Por otro lado, la vía de señalización iniciada por la secretina y el VIP está mediada por un incremento en el nivel de cAMP y la consecuente activación de la proteína cinasa A (PKA).²¹¹

2.2.3. Rutas de señalización intracelular

La mayor parte de los estudios se han centrado en el papel del Ca^{2+} como mensajero intracelular en células acinares pancreáticas. La estimulación de estas células con concentraciones suprafisiológicas de CCK, acetilcolina (o su análogo carbacol), o bombesina, produce un pico en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, seguido de una meseta, en la que la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se mantiene en valores superiores a los basales durante varios minutos después de la aplicación del estímulo. Estos resultados se interpretan admitiendo que el pico inicial se debe a la salida de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, mientras que la meseta sería consecuencia de su entrada desde el líquido extracelular, ya que, en ausencia de Ca^{2+} extracelular, la vuelta a las concentraciones iniciales tras el estímulo es mucho más rápida.³⁷³ La entrada de Ca^{2+} extracelular dependería del agotamiento de los depósitos intracelulares, ya que el estímulo, a través de la generación de IP_3 , produciría la salida de la mayor parte del Ca^{2+} almacenado.^{260,365}

Cuando las concentraciones de secretagogos son fisiológicas, el patrón de la señal de Ca^{2+} es completamente distinto, observándose oscilaciones de su concentración, en forma de espigas, que aparecen a una frecuencia de 0.5 a 5 por minuto, y que se producen incluso en ausencia de Ca^{2+} extracelular; esto se interpreta como una salida y entrada cíclicas del Ca^{2+} de los depósitos.³⁴⁸ En este caso, se piensa que los principales responsables de esta salida de Ca^{2+} serían la ADP ribosa cíclica (cADPR)²⁰² o el ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP),²⁰² aunque la participación del IP_3 no está totalmente descartada.²⁶⁰

El principal destino del Ca^{2+} citosólico es su unión con la proteína calmodulina. Como resultado de la unión Ca^{2+} -calmodulina se produce la activación de numerosas enzimas, entre las que cabría destacar varias proteínas cinasas, como la MLCK (cinasa de la cadena ligera de la miosina) o la PKC, y alguna fosfatasa, como la calcineurina dependiente de Ca^{2+} , que pueden tener efectos sobre la secreción enzimática.³⁷³ Otra posibilidad es que el Ca^{2+} se una, o regule de forma directa, a una de las proteínas de los gránulos de zimógeno y, como consecuencia de ello, se active la maquinaria de las proteínas SNARE.^{373,374}

El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ desencadena el proceso de exocitosis, que implica la fusión de los gránulos de zimógeno con la membrana apical.¹⁷⁴ Este proceso viene precedido por el avance de los gránulos a través de una red de filamentos de actina, que puede actuar favoreciendo o inhibiendo su movimiento hacia la membrana.²³⁰ Se ha comprobado que en el momento en que un estímulo de la secreción llega a la célula, tiene lugar un proceso de polimerización de la actina F, que hace que esta recubra los gránulos de zimógeno;²³⁰ este recubrimiento estabiliza la membrana del gránulo y supone una condición necesaria para que se produzca el proceso de exocitosis.³⁷² En la membrana de los gránulos de zimógeno hay una serie de proteínas que están implicadas en el empaquetamiento de las proenzimas digestivas, en el movimiento de los gránulos y en su fusión con la membrana apical.⁵⁶

Otros secretagogos, que activan la vía del cAMP, pueden también contribuir a la regulación de la secreción, a través de la activación de la PKA.⁵⁵ Estudios en acinos pancreáticos aislados de rata han mostrado que el tratamiento con inhibidores de la PKA reduce significativamente la respuesta secretora inducida por una combinación de carbacol, un agonista colinérgico, y 8-Br-cAMP, un análogo del cAMP.^{54,55} Aunque los mecanismos moleculares por los que la activación de la PKA induce la secreción enzimática en acinos pancreáticos apenas se han

investigado, se sabe desde hace mucho tiempo que existe una potenciación de la respuesta secretora ante la estimulación conjunta con secretagogos que actúan por la vía del Ca^{2+} y por la vía del cAMP.³¹⁶ Por otra parte, como se ha revisado en el apartado correspondiente a la regulación de la secreción en células ductulares, últimamente se le está dedicando bastante atención al posible papel de las proteínas Epac como efectores intracelulares del cAMP en las células acinares pancreáticas.⁵⁵

3. PANCREATITIS AGUDA

3.1. Generalidades

Las células acinares pancreáticas sintetizan grandes cantidades de enzimas, que representan, potencialmente, una considerable capacidad autodigestiva. Como ya se ha mencionado, en condiciones normales existen una serie de mecanismos que protegen al páncreas y previenen la autodigestión, como son el transporte intracelular de las proenzimas digestivas compartimentalizado, la secreción de enzimas como zimógenos inactivos, o la presencia de inhibidores de proteasas en las células acinares.¹⁰⁶

La pancreatitis se define como una inflamación pancreática acompañada de una destrucción total o parcial de la glándula. La clasificación de los distintos tipos de pancreatitis propuesta por Langerlof en 1942¹⁹⁸ divide estas en agudas, que en algunos casos son reversibles, y crónicas, que se caracterizan por ser progresivas.³¹⁴

Podemos definir como pancreatitis crónica aquella que cursa con lesión e inflamación crónica del páncreas, asociada a una desaparición del parénquima exocrino, fibrosis irreversible y posible destrucción del tejido endocrino, y puede ser considerada como leve, media o grave.¹⁸⁵ No vamos a revisar las características de cada uno de los tipos, ya que la pancreatitis crónica no es objeto de este estudio, y vamos a centrarnos en la pancreatitis aguda.

Bajo el término de pancreatitis aguda se agrupan una serie de lesiones inflamatorias del páncreas y también de los tejidos peripancreáticos, que pueden estar acompañadas de necrosis acinar, necrosis del tejido graso y/o hemorragia, según la clasificación propuesta por

Sarles *et al.* en 1989.²⁸⁹ Es un proceso autodigestivo de la glándula, en el cual esta se consume por su propia actividad enzimática. No está claro el proceso desencadenante de esta digestión, pero sí están bien identificados una serie de factores etiológicos de la enfermedad, como son litiasis biliar, consumo de alcohol, hiperlipidemia, trauma o determinados fármacos.³⁴⁹ La enfermedad puede presentar un curso benigno o asociarse a complicaciones sistémicas, apareciendo insuficiencia renal y respiratoria, *shock* circulatorio y, a menudo, la muerte.¹⁸⁵

La pancreatitis aguda se puede clasificar en dos grandes grupos:²³⁴

- **Edematosa:** también llamada intersticial. Es la forma menos grave y cursa con necrosis grasa peripancreática y edema intersticial, pero sin necrosis parenquimatosa, y se acompaña de un descenso en el valor del hematocrito. También es característica la presencia, en las células acinares, de vacuolas intracitoplasmáticas, que contienen tanto enzimas digestivas como hidrolasas lisosómicas.
- **Hemorrágica-necrotizante:** es la forma más grave de la enfermedad. Al principio de esta se produce una hemoconcentración, aumentando el valor del hematocrito. Se caracteriza por la existencia de una gran extensión necrótica, presente tanto en la zona peripancreática como en la intrapancreática, que va acompañada de hemorragia. Las funciones endo- y exocrina pueden verse alteradas durante un tiempo variable, que en el hombre puede ser desde algunas semanas hasta varios meses, si bien este tipo de pancreatitis está asociado a una elevada mortalidad.

3.2. Modelos experimentales de pancreatitis aguda

El estudio experimental de la pancreatitis aguda en animales se hace imprescindible a la hora de estudiar sus factores etiológicos y fisiopatológicos, así como en el intento de mejorar el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad. En el estudio de la pancreatitis aguda se han utilizado diferentes especies, entre las que se encuentran la rata, el ratón, el hámster, la zarigüeya, el gato, el perro y el mono.⁵²

Hay una gran variedad de protocolos para inducir pancreatitis aguda experimental, que difieren en metodología, gravedad de la enfermedad, extensión del proceso inflamatorio,

mortalidad asociada, etc. De esta forma, es posible elegir el más apropiado según la variable que se pretenda estudiar. Comentaremos muy brevemente algunos de estos modelos experimentales, divididos en tres grupos, y después nos centraremos en los tres modelos elegidos en el presente trabajo.

3.2.1. Modelos *in vivo* no invasivos

Pancreatitis aguda inducida por secretagogos

Diferentes secretagogos pueden inducir pancreatitis aguda por hiperestimulación del páncreas. En la actualidad, los secretagogos más utilizados para la inducción de pancreatitis aguda son la ceruleína (un análogo de la CCK),¹⁹⁹ el carbacol (un agonista colinérgico),⁵⁴ o anticolinesterasas.⁹⁶

La ceruleína es el secretagogo elegido en nuestro trabajo para inducir uno de los modelos de pancreatitis en la rata; por ello, más adelante trataremos este modelo con más profundidad.

Pancreatitis aguda inducida por la dieta

Se puede inducir pancreatitis aguda necrohemorrágica en el ratón mediante la administración de una dieta deficiente en colina y suplementada con etionina (CDE).²³⁸

Este modelo de pancreatitis inducida por la dieta se utiliza, sobre todo, para estudiar efectos a largo plazo de la pancreatitis, principalmente a nivel histológico. La mayor desventaja de este método es que solo se utiliza en el ratón, y existen importantes diferencias en la patogénesis de la pancreatitis entre esta especie y la humana.³³

Pancreatitis aguda inducida por L-arginina

El tratamiento con el aminoácido L-arginina puede inducir pancreatitis aguda de distinta gravedad, según la dosis y la pauta de administración. En el presente trabajo hemos utilizado este modelo, que ampliaremos más adelante, para inducir pancreatitis aguda de gravedad moderada.³⁴³

3.2.2. Modelos *in vivo* invasivos

Pancreatitis aguda inducida por cierre del asa duodenal

El modelo de inducción de pancreatitis por cierre del asa duodenal fue descrito en el perro por Pfeffer *et al.* en 1957.²⁶¹ El mecanismo que probablemente provoca la pancreatitis en este modelo es la distensión de la zona del duodeno aislada y el reflujo de enzimas activadas.²³³

Este método se ha usado en varias especies y con algunas modificaciones.^{38,59,232} Se utiliza para el análisis de los factores responsables del inicio de la pancreatitis, y más en concreto del papel que tiene el reflujo duodenal en las primeras fases de la enfermedad. La disponibilidad de otros modelos más simples de inducción de pancreatitis ha hecho que el uso de este método haya decaído en los últimos años.³⁶⁹

Pancreatitis aguda inducida por ligadura del conducto pancreático

Este modelo pretende reproducir la obstrucción causada por cálculos biliares, que puede conducir a la pancreatitis aguda, y se ha utilizado para estudiar hasta qué punto el reflujo de bilis inicia la pancreatitis.²⁰⁹

Existen modificaciones de este método, utilizadas para variar la gravedad de la pancreatitis. Por ejemplo, se puede combinar con la administración de secretagogos, como CCK,³⁸³ ceruleína¹⁴¹ o secretina,²¹⁰ o con estos secretagogos e isquemia pancreática.¹⁴²

Pancreatitis aguda inducida por cambios vasculares

La pancreatitis aguda puede inducirse mediante cambios en el flujo sanguíneo, provocados por la extracción y reinfusión de un elevado volumen de sangre,²³ por obstrucción venosa,³⁰⁹ o por alteraciones en la microcirculación pancreática, mediante la inyección de microesferas en los vasos sanguíneos.²⁶²

Este modelo de pancreatitis se viene utilizando para intentar esclarecer el papel de los cambios microvasculares en las primeras fases de la pancreatitis, así como en la aparición y extensión de la necrosis pancreática.¹⁸³ También se ha utilizado para evaluar medidas terapéuticas de mantenimiento isovolémico.¹⁸⁴ Por último, existen pruebas de que este modelo

puede progresar, en última instancia, hasta pancreatitis crónica, siendo útil para el estudio de esta enfermedad.⁹⁵

Pancreatitis aguda inducida por inyección de sustancias en el conducto pancreático

La inyección ductal de sustancias similares a la bilis, contenido duodenal o enzimas pancreáticas activas es uno de los métodos experimentales más utilizados para la inducción de pancreatitis aguda; las sustancias más empleadas son ácidos biliares, como el taurocolato⁵ o el glicodesoxicolato,²⁷⁸ el alcohol etílico³⁵² y agentes pro-oxidantes.³¹⁹

Existen diferentes formas de realizar la inyección: anterógrada o retrógrada, simple o infusión, etc. Por otra parte, la reproducibilidad de la lesión inflamatoria se puede controlar variando la sustancia inyectada, su concentración, la presión con la que se aplica y el tiempo. La cantidad de parámetros modificables hace que, dentro de este modelo de inducción de pancreatitis, existan diferentes protocolos experimentales.^{129,294,370}

En un apartado posterior revisaremos con más detalle el método de inducción de pancreatitis mediante infusión retrógrada de taurocolato sódico en el conducto pancreático, por ser uno de los utilizados en este trabajo.

3.2.3. Modelos *ex vivo*

Páncreas aislado y perfundido

El páncreas, generalmente de perro, puede aislarse y conectarse a un circuito de perfusión y oxigenación. Una vez conectado, se puede canular el conducto pancreático para inyectar sustancias de forma retrógrada.²⁸⁴ El principal inconveniente de este modelo, aparte de su compleja preparación, es que, en general, no se puede utilizar durante más de 4 horas.

3.3. Pancreatitis aguda inducida por ceruleína

La ceruleína es un decapeptido, análogo de la CCK, aislado por primera vez de la piel de la rana *Hyla caerulea*. La estructura molecular y la acción farmacológica de esta sustancia es muy similar a la de la CCK, pero su potencia es siete veces mayor que la de la hormona intestinal.¹⁶³

En la rata, la estimulación con dosis supramáximas de ceruleína provoca la aparición de una pancreatitis aguda edematosa, acompañada de un incremento de los niveles de enzimas pancreáticas en la sangre.^{199,285,368}

Este modelo se utiliza principalmente para el estudio de los fenómenos intracelulares en las fases iniciales de la pancreatitis, y tiene varias ventajas, entre las que destacan que no es un método invasivo, que permite un control del daño que se produce y que es aplicable a varias especies. La mayor limitación que presenta es que produce una pancreatitis leve, por lo que no es útil para el estudio de los aspectos más destructivos de la enfermedad.

La forma habitual de administración de la ceruleína consiste en la inyección de varias dosis por vía subcutánea a distintos tiempos, aunque también puede administrarse por inyección intraperitoneal o infusión intravenosa. En cualquier caso, los daños en el páncreas dependerán de la dosis y de la pauta de administración de la ceruleína, lo que permite conseguir diferentes niveles de gravedad de la enfermedad.³⁷¹

La ceruleína estimula la secreción pancreática exocrina, provocando un aumento en el volumen del jugo pancreático y favoreciendo la secreción de proteínas. Actúa a través de receptores de la CCK, y a dosis altas provoca, en las células acinares, la premaduración del tripsinógeno de manera dependiente de una hidrolasa lisosómica, la catepsina B.¹⁴³ Dentro de las células, la tripsina hidroliza y activa al tripsinógeno y a otras proenzimas;¹⁰⁸ la presencia de enzimas activadas dentro del páncreas es un factor clave en el desarrollo de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína,¹⁰⁹ ya que estas degradarían a las proteínas celulares, incluyendo a la F-actina, una proteína estructural básica para la célula, lo que inhibe la exocitosis.³¹⁷ Todos estos procesos, en conjunto, conducirían a la autodigestión del páncreas.

A nivel tisular, la inducción de pancreatitis aguda por ceruleína da lugar a una serie de alteraciones del sistema vascular, edema pancreático, respuesta inflamatoria y, en última instancia, necrosis de las células acinares. El estudio de la microvasculatura en este modelo revela que aproximadamente el 42% de los capilares pancreáticos muestra, al microscopio electrónico, un lumen colapsado.¹¹⁹ Esta reducción del flujo sanguíneo, junto al aumento de la permeabilidad capilar y de la filtración vascular, contribuye a la formación de edema en los estadios tempranos de la enfermedad. También el incremento de la presión oncótica del

tejido, por la liberación al intersticio de enzimas pancreáticas y productos hidrolíticos, puede contribuir al aumento del líquido intersticial. Por otro lado, poco tiempo después de la hiperestimulación con ceruleína se desencadena una respuesta inflamatoria, observándose en el páncreas un gran número de neutrófilos y, más tarde, fibroblastos y macrófagos.³⁰⁵

Por último, se sabe que ya en las primeras doce horas desde la inducción, las células acinares muestran claras alteraciones morfológicas (dilatación del retículo endoplasmático, condensación de la cromatina, formación de grandes vacuolas y pérdida del dominio apical), hasta que finalmente se desencadena la muerte celular, tanto por necrosis como por apoptosis.¹⁶⁹

3.4. Pancreatitis aguda inducida por L-arginina

Este modelo fue descrito en la rata por Tani *et al.* en 1990,³⁴³ basándose en los resultados publicados por Mizunuma *et al.* en 1984,²²⁹ y provoca una pancreatitis aguda necrotizante utilizando una única dosis muy alta de L-arginina.

La forma de administración utilizada normalmente es la inyección intraperitoneal, y variando la dosis y las pautas de administración puede inducirse pancreatitis aguda de distinta gravedad.¹³⁵

Este modelo presenta las mismas ventajas que el inducido por ceruleína, es decir, es aplicable a varias especies, permite un control de la gravedad del daño y es un método no invasivo. Además, hay que añadir que la arginina posee un efecto tóxico muy específico sobre el páncreas.

El mecanismo por el cual la arginina induce pancreatitis aguda está aún por esclarecer, pero se cree que en el desarrollo de la enfermedad podrían estar involucrados algunos factores, como la inhibición de la síntesis de proteínas,¹⁸² la producción excesiva de óxido nítrico,³³⁹ la peroxidación lipídica,⁷⁰ o la liberación de mediadores inflamatorios.⁷¹ Como el tejido pancreático posee un metabolismo proteico muy activo, es especialmente vulnerable a este tipo de toxicidad.

En cuanto a las manifestaciones histológicas, con dosis bajas de arginina se induce una pancreatitis aguda de gravedad moderada, caracterizada por un deterioro tisular leve, que incluye edema intersticial, infiltración de células inflamatorias y degranulación de las células acinares.⁷⁰ Cuando se inyecta una sola dosis alta de arginina, se produce una pancreatitis aguda necrotizante, con necrosis masiva del tejido y destrucción de la estructura acinar a los tres días de la inducción.³⁴⁴

3.5. Pancreatitis aguda inducida por taurocolato sódico

El modelo de inducción de pancreatitis aguda mediante infusión retrógrada de taurocolato sódico en el conducto pancreático de la rata fue estandarizado por Aho *et al.* en 1980.⁵ Desde entonces se ha usado en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la pancreatitis aguda. Este modelo es el elegido en nuestro trabajo para conseguir una pancreatitis aguda necrohemorrágica grave.

Existen diferentes protocolos de inducción de pancreatitis mediante infusión retrógrada de taurocolato, en los cuales varía la velocidad y el volumen de infusión, así como la concentración de taurocolato y, con todo ello, la gravedad de la pancreatitis.^{73,208,296,354}

Una de las ventajas de este modelo es que es aplicable a especies cuyo sistema ductal pancreático pueda ser canulado fácilmente; la rata, por su tamaño, es un animal idóneo para este tipo de experimentos.⁹⁷ Otra ventaja es que permite un control de la gravedad de la enfermedad. La mayor desventaja es que se trata de un modelo invasivo y es un procedimiento moderadamente complejo.

La pancreatitis aguda grave que se desarrolla entre las dos y las veinticuatro horas después de la infusión se caracteriza por edema, necrosis y hemorragia pancreática. Mediante estudios morfológicos y bioquímicos se ha revelado el carácter autodigestivo del daño pancreático en este modelo experimental, aunque se ha comprobado que el taurocolato sódico daña el epitelio ductal y el parénquima acinar antes de que se activen las enzimas pancreáticas.⁵ El taurocolato inyectado, que puede permanecer varias horas en el páncreas, alcanza los conductos periféricos y se introduce en los tejidos intersticiales, actuando sobre la zona basal de las células acinares y provocando su necrosis y la autodigestión de la glándula.⁵

Este modelo de pancreatitis, que es especialmente útil para estudiar los aspectos sistémicos de la enfermedad, está asociado a una elevada mortalidad: la infusión retrógrada de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de taurocolato sódico al 5% en el conducto pancreático de la rata provoca una mortalidad del 100% de los animales a las 72 horas.⁶

Por otro lado, se ha descrito que la infusión retrógrada de solución salina en el conducto pancreático induce pancreatitis aguda leve.^{101,212,355} Por lo tanto, el daño pancreático no se atribuye únicamente a la sustancia exógena infundida, sino también a su combinación con el aumento de la presión hidrostática asociado a la infusión.

3.6. Papel de las células ductulares en la fisiopatología de la pancreatitis aguda

Debido a que las células acinares contienen enzimas digestivas y a que la mayor parte del daño en los diferentes modelos de pancreatitis aguda ocurre en ellas, los estudios sobre las causas y desarrollo de la enfermedad se han centrado en este tipo celular.²⁸⁶ Sin embargo, se han dedicado pocos estudios a examinar la eventual alteración de la fisiología de los conductos en la pancreatitis aguda, lo que resulta sorprendente, teniendo en cuenta que estos juegan también un papel importante en la protección del páncreas y que, si esta protección falla, podría contribuir al desarrollo de la pancreatitis.

Como ya se ha mencionado, la función central del componente ductular del páncreas es la secreción de una gran cantidad de agua y electrolitos (principalmente HCO_3^-), que forman parte del jugo pancreático. Este fluido es necesario para el arrastre de las enzimas digestivas desde las células acinares hasta su lugar de acción y el HCO_3^- es esencial para neutralizar el pH ácido gástrico en el duodeno y alcalinizar el jugo pancreático durante su recorrido, impidiendo la activación prematura de las enzimas pancreáticas.^{13,207} Por lo tanto, la coordinación entre los procesos de síntesis, procesamiento y secreción de enzimas digestivas por las células acinares y la secreción de agua y electrolitos por las células ductulares es de crucial importancia en el buen funcionamiento de la glándula, ya que el fallo en la secreción ductular podría provocar daños en las células acinares.

Se ha descrito que la secreción de fluido pancreático aumenta significativamente en el inicio de la pancreatitis aguda en ratas, lo que supondría un mecanismo defensivo, de lavado, que podría atenuar la gravedad de la enfermedad.^{68,224} Una prueba adicional de la importancia de esta hipersecreción de fluido es que la secretina exógena parece jugar un papel protector en el desarrollo de la pancreatitis inducida por ceruleína,^{223,272} aunque la importancia real de este efecto está bastante discutida.²⁰⁰ En contraste con la hipersecreción de fluido que se produce en etapas tempranas de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína, la secreción de las células ductulares queda inhibida en fases más avanzadas de la enfermedad.²¹

Se han llevado a cabo estudios en segmentos de conductos pancreáticos de cobaya, perfundiendo el lumen o la membrana basolateral con distintas soluciones que contienen un ácido biliar no conjugado, el quenodesoxicolato.³⁵⁹ Cuando se expone el lumen a concentraciones bajas de quenodesoxicolato, la secreción de HCO_3^- a través de intercambiadores aniónicos luminales de las células ductulares se estimula.³⁵⁹ El incremento del Ca^{2+} intracelular parece jugar un papel importante durante esta hipersecreción inducida por ácidos biliares. En un trabajo reciente se ha investigado el papel de canales iónicos dependientes de Ca^{2+} en la respuesta al quenodesoxicolato, utilizando técnicas de *patch-clamp* en células ductulares de cobaya,³⁶⁰ y se ha descrito que en este efecto estimulante del ácido biliar intervienen canales de K^+ de alta conductancia, dependientes de Ca^{2+} y de voltaje (maxi- K^+), presentes en la membrana luminal de las células ductulares.

En contraste, las concentraciones elevadas de quenodesoxicolato dañan la barrera epitelial en conductos de cobaya³⁵⁹ y de vaca,¹⁰ de forma que los mecanismos de secreción de las células ductulares quedan inhibidos y los conductos no pueden seguir actuando como defensa ante la toxicidad de los ácidos biliares.

Con todo lo expuesto, la hipótesis planteada sería que, en las fases tempranas de la pancreatitis aguda, el incremento de la secreción ductular de HCO_3^- y de fluido podría defender al páncreas, arrastrando los agentes tóxicos (ácidos biliares) y las enzimas digestivas. Si este mecanismo falla, como consecuencia de la presencia de concentraciones altas de ácidos biliares, se desencadenaría la pancreatitis.

Por otra parte, en la línea celular ductular pancreática CFPAC-1, carente de CFTR funcional, se ha descrito que el ácido biliar quenodesoxicolato, a concentraciones moderadas, disminuye el pH_i , incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular y estimula la actividad del intercambiador de aniones apical, el SLC26A6; estos efectos se ponen de manifiesto únicamente en células CFPAC-1 en las que se induce la expresión del CFTR nativo por medio de un virus Sendai.¹⁵⁰ Para determinar si el quenodesoxicolato estimula directamente al intercambiador aniónico o lo hace indirectamente, a través de la activación del CFTR, se han realizado experimentos de *patch-clamp*, demostrando que se requiere la expresión del CFTR, pero no su actividad como canal aniónico.¹⁵⁰

Recientemente, se ha investigado el papel de la galanina, un neurotransmisor que actúa en el sistema nervioso central y periférico, en distintos modelos de pancreatitis aguda. Varios estudios han sugerido que la galanina contribuye al desarrollo de la enfermedad, disminuyendo la perfusión vascular pancreática en la zarigüeya,³⁰ aumentando la inflamación neurogénica en el ratón,²⁹³ e inhibiendo la secreción de enzimas pancreáticas en la rata³³⁸ y el ratón.²² Estudios en ratones con pancreatitis aguda inducida por ceruleína revelan que la administración de galantida, un antagonista de los receptores de galanina, atenúa la enfermedad.²⁶ Además, en ratones *knockout* para la galanina a los que se les indujo pancreatitis aguda con ceruleína, la cantidad de enzimas pancreáticas en el plasma, la actividad mieloperoxidasa y la necrosis de células pancreáticas fueron mucho menores que en ratones sanos.²⁶ Se ha descrito que la galanina inhibe el 90% de la secreción basal de HCO_3^- en el páncreas inervado de perro, mientras que la inhibición fue mucho menor en el páncreas denervado, lo que sugiere la implicación de factores neurales en el efecto de este péptido sobre la secreción ductular de HCO_3^- .²⁹ Se ha postulado que la galanina estaría implicada en la reducción de la secreción de fluido y electrolitos que aparece en etapas avanzadas de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína.¹³⁶

Los estudios más recientes se han centrado en una molécula de vital importancia para las células, el ATP, catalogada como molécula central en la pancreatitis aguda. Hace más de 30 años se observó un daño mitocondrial acinar en el modelo de pancreatitis aguda inducida por taurocolato en la rata,⁵ pero el ATP no ha sido objeto de estudio hasta fechas recientes. En condiciones normales, el metabolismo aerobio de la mitocondria genera ATP, y una pequeña

cantidad proviene de la ruta glicolítica. En condiciones anaeróbicas disminuye la producción de ATP, y el aportado por la glicolisis no es suficiente para mantener la correcta funcionalidad de las células pancreáticas; esta última situación se produce cuando en el tejido pancreático existe una disfunción microvascular, característica de la pancreatitis aguda. El ATP es necesario tanto para la secreción de enzimas de las células acinares^{37,125} como para la secreción de HCO_3^- de las ductulares.²¹⁹ Recientemente, Voronina *et al.*³⁶⁴ han demostrado que los ácidos grasos y los ácidos biliares inhiben la producción de ATP en células acinares del páncreas del ratón, mientras que Maleth *et al.*²¹⁹ han sugerido que los ácidos biliares pueden inducir el mismo tipo de daño metabólico en las células ductulares del páncreas de cobaya.

4. FIBROSIS QUÍSTICA

4.1. Generalidades

La fibrosis quística (CF) es una enfermedad hereditaria, autosómica recesiva, y constituye la alteración genética letal más frecuente entre la población de raza caucásica. Esta enfermedad está provocada por alteraciones en el gen que codifica para la proteína conocida como *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR), localizado en el cromosoma 7 en humanos. La proteína CFTR funciona como un canal aniónico dependiente de la fosforilación por proteína cinasa A pero, además, como ya se ha descrito, regula la función de muchos otros sistemas de transporte a través de la membrana plasmática. En humanos, este gen se expresa solo en ciertos tipos celulares, como son conductos pancreáticos, enterocitos, células del epitelio renal, del epitelio respiratorio, de las vías biliares, de las glándulas sudoríparas y del tracto reproductor. En general, la mayoría de las mutaciones en el gen *cftr*, en humanos, dan lugar a un procesamiento anormal de la proteína CFTR y al fallo en su inserción en la membrana plasmática de las células de los diferentes tejidos en los que se expresa. Como consecuencia, se produce una pérdida de funcionalidad del CFTR, lo que provoca la presencia de una elevada concentración de electrolitos en el sudor, un incremento en la viscosidad de las secreciones mucosas, una reducción de la permeabilidad a los iones en el epitelio respiratorio superior y una gran susceptibilidad a infecciones respiratorias crónicas, junto con una secreción iónica

disminuida en muchos epitelios digestivos tras la estimulación con secretagogos. Esto conduce a alteraciones secundarias en el páncreas exocrino, tracto respiratorio y sistema reproductor masculino, siendo las alteraciones pulmonares y la insuficiencia pancreática las afecciones más graves y típicas en el cuadro clínico de los enfermos con fibrosis quística.²⁷⁹

Esta enfermedad puede provocar, además, otra serie de manifestaciones muy diversas, entre las que se incluyen íleo meconial, peritonitis, retraso en el desarrollo, poliposis nasal, malabsorción o cirrosis.¹²⁴

4.2. Modelos experimentales de fibrosis quística

Uno de los avances experimentales más importantes en el estudio de los mecanismos y complejidades de las enfermedades humanas ha sido el desarrollo de modelos animales con deficiencias genéticas; una de las especies más utilizadas actualmente es el ratón. La falta de un buen modelo animal de fibrosis quística complicó el estudio de sus mecanismos fisiopatológicos, hasta que varios grupos produjeron cepas de ratones con alteraciones en el gen que codifica para el CFTR (ratones CF).^{269,321} Estos animales se han empleado en este trabajo, ya que sus conductos pancreáticos son un modelo muy útil en el estudio de los mecanismos secretores de las células ductulares en ausencia de CFTR.^{254,256,288} Además, los modelos de ratones CF son muy utilizados para analizar cómo afecta esta enfermedad a diferentes tejidos, sobre todo pulmones y páncreas. Otro modelo más reciente es el de cerdos modificados genéticamente; como esta especie comparte muchas características anatómicas y fisiológicas con el ser humano, puede ser un modelo más útil para el estudio de la CF que los modelos de ratón.²⁷⁶ También se han desarrollado varias líneas celulares humanas y de ratones para el estudio de la fibrosis quística; en concreto, la línea celular CFPAC-1, inmortalizada a partir de un adenocarcinoma pancreático de un paciente con fibrosis quística, ha sido muy útil para el estudio de la patología de la glándula.²⁹⁷ En este apartado revisaremos algunos de estos modelos.

4.2.1. Modelos de ratones para el estudio de la fibrosis quística

En el estudio de las enfermedades en general, los modelos en ratón poseen varias ventajas, comparados con otros modelos animales, que incluyen el bajo coste, el fácil mantenimiento, la alta tasa de reproducción y la relativa facilidad para su manipulación genética. Sin embargo, las diferencias anatómicas e inmunológicas entre ratones y humanos hacen que estos modelos presenten limitaciones, que deben considerarse a la hora de interpretar y extrapolar los resultados obtenidos.

El uso de modelos de ratones CF para el estudio de la fibrosis quística resulta útil por varias razones. En primer lugar, un modelo animal permite emprender un estudio más profundo de la fisiopatología de la enfermedad de lo que es posible realizar en seres humanos. En la población humana hay una heterogeneidad muy marcada en la expresión fenotípica de la enfermedad, incluso entre pacientes que poseen genotipos idénticos, por lo que un modelo animal CF permite la identificación de los genes que condicionan el fenotipo de los pacientes con esta enfermedad, así como el estudio de las influencias ambientales que modifican su expresión. Un modelo animal también es útil para probar estrategias farmacológicas que ayuden a modificar los diferentes estados e intensidad de la enfermedad. Por último, los modelos animales son útiles para probar protocolos de terapia génica y así determinar la eficacia de los vectores utilizados para corregir los fallos en los mecanismos de transporte iónico, y comprobar cuánto tiempo se mantiene dicha corrección.

El gen *cftr* fue identificado y clonado en 1989;²⁷⁵ solo tres años más tarde se generó el primer modelo de ratón CF³²¹ y, a partir de entonces, se han ido generando otros modelos. En la siguiente tabla se recogen las cepas de ratones modificados genéticamente más utilizadas en el estudio de la fibrosis quística.¹²⁴ La cepa *Cftr*^{tm1Cam}, generada por Ratcliff *et al.* en 1993,²⁶⁹ ha sido la utilizada en nuestro estudio.

	Ratón CF	Técnica Molecular
CFTR knockouts	<i>Cftr</i> ^{tm1Unc}	Parada en marco (exón 10)
	<i>Cftr</i> ^{tm1Hgu}	Inserción (exón 10)
	<i>Cftr</i>^{tm1Cam}	Inserción (exón 10)
	<i>Cftr</i> ^{tm1Bay}	Duplicación (exón 3)
	<i>Cftr</i> ^{tm3Bay}	Parada en marco (exón 2)
	<i>Cftr</i> ^{tm1Hsc}	Inserción (exón 1)
Otras mutaciones	<i>Cftr</i> ^{tm1Kth}	Recombinación homóloga (Δ F508)
	<i>Cftr</i> ^{tm1Eur}	Recombinación homóloga (Δ F508)
	<i>Cftr</i> ^{tm2Cam}	Recombinación homóloga (Δ F508)
	<i>Cftr</i> ^{tm1G551D}	Recombinación homóloga (G551D)
	<i>Cftr</i> ^{tm2Hgu}	Recombinación homóloga (G480C)

Los distintos modelos difieren entre sí en la gravedad relativa de las manifestaciones patológicas en distintos órganos y sistemas, así como en la supervivencia de los animales. Todos ellos se han generado mediante técnicas similares: una vez se tiene transformado el gen *cftr* de la manera deseada (recombinación, inserción, duplicación, etc.), se introduce en un vector que se inserta en las células embrionarias de ratón. La recombinación homóloga o integración del gen transformado en el lugar homólogo del gen de la célula embrionaria se produce en un porcentaje pequeño de estas células.¹⁸⁹

Se ha estudiado la fisiopatología de tejidos y órganos afectados por la enfermedad (intestino, vía aérea y hepatobiliar, páncreas, tejido reproductor y salival) en los diferentes modelos de ratón CF. Además, se han comparado estas alteraciones con las observadas en la enfermedad en humanos. Algunos de los modelos de ratón CF reflejan de manera exacta las alteraciones que se producen en el transporte iónico observadas en pacientes humanos, especialmente en el tubo digestivo. Sin embargo, las alteraciones en el transporte iónico en el páncreas, así como las producidas en las vías aéreas, que conducen a la enfermedad pulmonar, parecen estar ausentes en gran medida en los modelos de ratón CF.

Los daños intestinales de la enfermedad en ratones CF son graves y en último lugar llevan a la obstrucción y perforación intestinal, peritonitis y muerte.^{77,249,353} Estas alteraciones son muy parecidas a las observadas en humanos con CF; por ejemplo, la obstrucción intestinal es semejante al íleo meconial observado en humanos. La patología intestinal está presente en todos los modelos, excepto en *Cftr*^{tm1Hgu}, *Cftr*^{tm1Eur} y *Cftr*^{tm2Hgu}. Recientemente se ha utilizado talniflumato oral en ratones CF (*Cftr*^{tm1Unc} y *Cftr*^{tm1Kth}) con síndrome obstructivo intestinal y se ha observado que este fármaco tiene efectos beneficiosos sobre la supervivencia de estos ratones, ya que disminuye la absorción intestinal de NaCl a través de la inhibición de los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- apicales del epitelio intestinal.³⁶⁶

En muchos modelos de ratones CF no se ha observado ninguna patología hepatobiliar, tal vez por el hecho de que los estudios se llevan a cabo en ratones muy jóvenes, mientras que en humanos las alteraciones hepáticas suelen aparecer a edades avanzadas. Sin embargo, en el modelo *Cftr*^{tm1G551D}, el 20% de los ratones presentan hiperplasia en el epitelio ductular biliar.⁷⁷ En general, los modelos de ratón CF parecen presentar más alteraciones en la vesícula biliar^{77,321} que en el hígado, aunque la patología es bastante variable. Comprender la patología de la vesícula biliar podría ayudar a encontrar un tratamiento para la frecuente formación de cálculos biliares y malformaciones en este órgano observadas en humanos con CF.

El páncreas es uno de los órganos que están gravemente dañados en humanos con fibrosis quística. Las alteraciones en este órgano incluyen fibrosis intra- y extralobular, y obstrucción del sistema ductular por secreciones viscosas y restos celulares, que suelen provocar la formación de quistes y, con frecuencia, insuficiencia pancreática, tanto exocrina como endocrina. Se suele aceptar que estas alteraciones son consecuencia de un bloqueo en los mecanismos de secreción de agua y electrolitos en los conductos pancreáticos; sin embargo, y debido sobre todo a las dificultades asociadas con la medida directa de la secreción de las células ductulares pancreáticas, sin interferencias de las células acinares, esto nunca se ha probado más allá de toda duda.

Las alteraciones pancreáticas que presentan los ratones CF no son comparables, en cuanto a su gravedad, a las que se pueden observar en el páncreas de pacientes con esta enfermedad. Snouwaert *et al.*³²¹ describieron por primera vez, en 1992, esta falta relativa de patología en el páncreas de ratones *Cftr*^{tm1Unc}. Años más tarde, estudios en esta misma cepa sí revelaron la

existencia de una dilatación del lumen de los conductos y acumulación de gránulos de zimógeno en el polo apical de las células acinares.⁹³ En el modelo *Cftr*^{tm1Cam} se ha descrito el bloqueo de aproximadamente el 50% de los conductos pancreáticos de pequeño tamaño, aunque estas lesiones no fueron lo suficientemente graves como para alterar la función pancreática.²⁶⁹ En experimentos con ratones *knockout Cftr*^{tm1Bay} y *Cftr*^{tm3Bay} se encontró atrofia acinar, que fue más acusada en animales de edad avanzada. Por otro lado, los ratones *Cftr*^{tm1Hgu} no presentaron patología pancreática alguna, ni malabsorción u otros problemas intestinales. Tampoco los modelos $\Delta F508$ y $G551D$ presentaron patología pancreática obvia.^{64,77,353} El hecho de que en muchos modelos exista una patología pancreática muy leve podría explicarse bien porque expresen una actividad CFTR residual, que sea suficiente para mantener la secreción,⁷⁹ o bien porque otros canales de Cl^- , probablemente los activados por Ca^{2+} , sustituyan la función del CFTR.^{63,115}

En un trabajo publicado por nuestro grupo,²⁵⁶ utilizando ratones de la cepa *Cftr*^{tm1Cam}, hemos demostrado que los conductos pancreáticos aislados de estos animales muestran una secreción de fluido disminuida, pero significativa, en respuesta al aumento de los niveles de cAMP tras la estimulación con forskolina. Esta secreción no depende del CFTR (cuya expresión residual es nula en este modelo)²⁶⁹ ni de la actividad de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} ,²⁵⁶ los mecanismos de transporte epitelial responsables de esta secreción residual permanecen sin esclarecer, y su identificación forma parte de los objetivos de este trabajo.

4.2.2. Modelo de fibrosis quística en cerdos recién nacidos

Más de dos décadas después de que fuera identificado el gen *cftr* como responsable de la fibrosis quística, aún se desconocen muchos aspectos de la patogénesis de la enfermedad. Aunque los ratones CF han facilitado mucho los estudios de la fibrosis quística, estos animales no desarrollan algunas de las manifestaciones patológicas características de la enfermedad en humanos. Los cerdos comparten muchas características anatómicas y fisiológicas con los humanos, por lo que un modelo de CF en esta especie podría proporcionar información sobre muchas cuestiones que aún están por aclarar sobre la patogénesis de esta enfermedad, y acelerar el descubrimiento de estrategias para su tratamiento. Recientemente, se ha generado un modelo de cerdo con modificaciones en los dos alelos del gen *cftr*.²⁷⁶

En general, los órganos digestivos que se ven afectados por la enfermedad en cerdos CF comparten una serie de características, como son la excesiva secreción mucosa por las células epiteliales, acumulación de moco e inflamación.²²⁸

Los cerdos recién nacidos que carecen de CFTR presentan un transporte de Cl^- deficiente y desarrollan íleo meconial, exactamente igual que en humanos recién nacidos con fibrosis quística.²⁷⁶ Las lesiones pancreáticas de los cerdos CF son ubicuas, existiendo una gravedad variable en la destrucción del tejido pancreático exocrino.²²⁸ Además, en estos animales, el tejido exocrino se reemplaza por tejido conectivo, disminuye el número de células acinares y de gránulos de zimógeno, y el lumen acinar y ductular del páncreas contiene precipitados proteicos, al igual que ocurre en el páncreas de niños recién nacidos con fibrosis quística.⁸² Por otro lado, en la porción ductular de la glándula, se observan focos de proliferación, sobre todo en zonas donde existe una gran destrucción de tejido,²²⁸ como también sucede en humanos con la enfermedad.³³³ En cuanto al tejido endocrino, no existe destrucción tisular y parece estar morfológicamente intacto en estos animales.²⁷⁶

OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación ha abordado, en los últimos años, el estudio de los mecanismos moleculares de transporte de electrolitos responsables de la secreción en las células ductulares del páncreas del ratón. El principal interés de esta línea de investigación podemos encontrarlo en el hecho de que, en ratones *knockout* para el CFTR, de la cepa $Cftr^{tm1Cam}$ (ratones CF), el páncreas exocrino mantiene una funcionalidad reducida, pero más que suficiente para evitar los daños patológicos que caracterizan a la falta de esta proteína funcional en la especie humana, es decir, a la fibrosis quística.

Nuestros resultados más relevantes en este campo ponen de manifiesto que, en conductos pancreáticos de ratones CF, se mantiene una capacidad secretora significativa, tanto en respuesta a secretagogos que actúan elevando el cAMP (forskolina) como en respuesta a los que lo hacen a través de la ruta del Ca^{2+} citosólico libre (carbacol). Esta secreción de fluido en ratones CF, que está prácticamente anulada en la especie humana, está mediada tanto por el transporte de iones Cl^- como de iones HCO_3^- ; por otra parte, la secreción estimulada por forskolina no depende, obviamente, del CFTR, ausente en estos animales, ni de la activación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} (que sí están implicados de forma directa en la respuesta secretora al carbacol). Así pues, hemos concluido que en las células ductulares de los ratones CF existe al menos un mecanismo de transporte iónico, no identificado hasta la fecha, capaz de mantener una secreción residual de agua y electrolitos; este mecanismo estaría ausente o sería poco funcional en las células ductulares del páncreas humano. En consecuencia, uno de los objetivos generales del presente trabajo consiste en avanzar en la identificación y caracterización de este mecanismo o mecanismos.

El hecho de que la forskolina pueda estimular la secreción de las células ductulares carentes de CFTR plantea, además, otra interesante cuestión: si la idea general es que la activación de la secreción de agua y electrolitos en este tipo celular depende de la fosforilación del CFTR por la proteína cinasa A (PKA), ¿cuál es el efector del incremento del cAMP en ratones en los que no existe CFTR? Nuestra principal hipótesis para explicar la secreción en ausencia del CFTR es la intervención del intercambiador aniónico electrogénico luminal, el SLC26A6; sin embargo, se ha podido comprobar que la actividad de este intercambiador depende de forma directa de su interacción molecular con el CFTR fosforilado. A la vista de esto, debemos considerar que en las células ductulares del páncreas de ratones CF la elevación del cAMP

puede actuar sobre una diana diferente del CFTR, y que este hipotético mecanismo podría también contribuir a la estimulación de la secreción en ratones con CFTR funcional. Otro de los objetivos generales de este trabajo ha sido investigar los mecanismos intracelulares de actuación del cAMP en células ductulares pancreáticas del ratón, analizando si la respuesta secretora depende de la actividad de la PKA, y estudiando la posible participación de una ruta alternativa activada por el cAMP, iniciada por la unión de este nucleótido cíclico a las proteínas Epac.

Así pues, dentro de este apartado del trabajo, nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

1. Investigar si la respuesta secretora al incremento en la concentración de cAMP depende de la activación de la PKA en los conductos pancreáticos de ratones normales y CF.
2. Investigar si la activación de la ruta intracelular iniciada por la unión del cAMP a las proteínas Epac está implicada en la regulación de los fenómenos secretores en conductos pancreáticos del ratón.
3. Investigar el mecanismo que mantiene la secreción ductular en ratones CF, mediante el estudio de los cambios en la conductancia aniónica inducidos por el cAMP en células ductulares pancreáticas.

En la especie humana, la fibrosis quística está normalmente asociada con graves alteraciones en la funcionalidad, no solo de las células ductulares del páncreas, sino también de las acinares, que a menudo acaban provocando insuficiencia pancreática. Estas alteraciones en el componente acinar se han interpretado como un fenómeno secundario al bloqueo de la secreción hidroelectrolítica procedente del árbol ductal. Sin embargo, no se puede descartar que la falta del CFTR, que también se expresa en las células acinares de algunas especies, incluyendo al ratón, contribuya de forma primaria a modificar la fisiología de este tipo celular. En relación con esto, nos planteamos el siguiente objetivo:

1. Analizar las posibles alteraciones en la secreción enzimática, así como en la señal del calcio citosólico libre, en acinos pancreáticos de ratones CF, en situación basal y en respuesta a la estimulación con secretagogos.

La falta de financiación para esta línea de investigación hizo inevitable su interrupción, lo que incluyó la eliminación de la cepa *Cftr^{tm1Cam}* de nuestras instalaciones. Por este motivo, continuamos este trabajo abordando otros aspectos de la función de las células ductulares del páncreas, en este caso analizando su contribución a la fisiopatología de la pancreatitis aguda experimental en ratas.

La mayoría de los estudios existentes acerca de la fisiopatología de la pancreatitis aguda se han centrado en las alteraciones que se desarrollan en las células acinares pancreáticas durante esta enfermedad, tanto en humanos como en modelos animales. Recientemente, sin embargo, está cobrando fuerza la hipótesis de que las células ductulares pancreáticas pueden intervenir de manera decisiva en el desarrollo de esta patología. Partiendo de nuestra experiencia previa, tanto en el estudio de la fisiología de los conductos pancreáticos, como en diversos modelos de inducción de pancreatitis aguda en ratas, diseñamos una serie de experimentos en los que hemos pretendido investigar la funcionalidad de los mecanismos de transporte de electrolitos en las células ductulares de esta especie, utilizando para ello tres modelos experimentales de pancreatitis aguda, caracterizados por su diferente gravedad. Los objetivos concretos de esta parte del trabajo fueron los siguientes:

1. Analizar las posibles alteraciones en la secreción de agua y electrolitos en conductos pancreáticos de ratas a las que se indujo pancreatitis aguda mediante tres procedimientos diferentes: infusión retrógrada de taurocolato sódico en el conducto biliopancreático, administración de dosis elevadas de L-arginina, e hiperestimulación con ceruleína.
2. Investigar la funcionalidad de los transportadores de membrana implicados en la secreción de electrolitos en aquellos modelos de pancreatitis aguda en los que se observe algún tipo de alteración en la secreción ductular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PRODUCTOS QUÍMICOS

Los principales productos químicos utilizados en este trabajo se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

Sigma-Aldrich:

- 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX).
- 5-(N-etil-N-isopropil) amilorida (EIPA).
- Ácido 3-(Aminosulfonil)-5-(butilamino)-4-fenoxibenzoico (Bumetanida).
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA).
- Ácido N-(2-dihidroxiethyl)piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES).
- Ácido Plurónico® F-127.
- Agarosa.
- Anfotericina B (procedente de *Streptomyces sp.*).
- Aspartato sódico.
- Azida sódica.
- Azul de bromofenol.
- BME aminoácidos.
- BME vitaminas esenciales.
- Bromuro de etidio.
- Ceruleína sulfatada.
- Cloruro de carbamilcolina (Carbacol).
- Colecistocinina (octapéptido C-terminal sulfatado, CCK-8).
- Digitonina.
- Dimetilsulfóxido (DMSO).
- Dodecil sulfato sódico (SDS).
- Elastasa (procedente de páncreas porcino).
- Fumarato sódico.
- Glicerol.
- Glutamato sódico.
- Hialuronidasa tipo IV-S (procedente de testículo bovino).
- Inhibidor de tripsina de soja tipo II-S (SBTI).
- Isopropanol.
- L-Arginina.
- L-Glutamina.
- Marcador de peso molecular de DNA.
- Medio Dulbecco's Modified Eagle's (modificación HEPES) (DMEM).
- Medio McCoy's 5A Modified.
- N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamida dihidrocloruro (H-89).
- Nigericina (sal sódica).
- N-Metil-D-glucamina (NMDG).

- Oligonucleótidos: CFTRF, CFTRR, HPRTF y HPRTR.
- Penicilina-estreptomicina (solución estabilizada).
- Piruvato sódico.
- Polietilenglicol 8000.
- Proteínasa K (procedente de *Tritirachium album*).
- Seroalbúmina bovina (BSA).
- Suero de ternera fetal (FBS).
- Taurocolato sódico.
- Tris-(hidroximetil)-aminometano (Trizma® base).
- Xilen-cianol FF.

Kapa Biosystems:

- KAPA Taq ReadyMix DNA Polimerasa (20 mM Tris-HCl; 100 mM KCl; 0.1% Tween 20; 1 mM DTT; 10% glicerol; 3 mM MgCl₂; 0.05 U·μl⁻¹ Kapa Taq; 0.4 mM de cada dNTP).

Bio-Rad Laboratories:

- Buffer 50x Tris-Acetato-EDTA (TAE).

Worthington Biochemical Corporation:

- Colagenasa purificada CLSPA (procedente de *Clostridium histolyticum*).

Schering-Plough Animal Health:

- Isoflurano (Isoba® vet).

Merck:

- Dexametasona (Fortecortín).

Novo Nordisk:

- Insulina humana (Actrapid).

Magle Life Sciences:

- Phadebas® Amylase Test.

Collaborative Biomedical Products/Becton Dickinson Bioscience:

- Cell-Tak™.

Molecular Probes:

- 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(γ-6)-carboxifluoresceína, acetoximetil éster (BCECF-AM).
- Ácido 4,4'-diisotiocianatodihidrostilbeno-2,2'-disulfónico, sal disódica (H₂DIDS).

Tocris:

- Forskolina.

Biolog Life Science Institut:

- 8-(4-Tioclorofenil)-2'-O-metil-cAMP (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP).
- N⁶-Benzoil-cAMP.

In vitro:

- Fura-2, acetoximetil éster (Fura-2-AM).

Todos los demás productos químicos utilizados, que no aparecen en la relación anterior, fueron de elevado grado de pureza.

2. ANIMALES Y TRATAMIENTOS

Todos los animales utilizados en el presente trabajo se obtuvieron en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los protocolos experimentales cumplen estrictamente la normativa vigente referente a la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, BOE nº 252), y han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

Para nuestros estudios se utilizaron los siguientes animales y tratamientos:

- Ratones macho de la cepa CD1, cuyo peso estaba comprendido entre 16 y 24 g.
- Ratones de la cepa $Cftr^{tm1Cam}$, *knockout* para *cftr* (*cystic fibrosis transmembrane regulator*), producida en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Cambridge mediante la técnica descrita por Ratcliff *et al.*²⁶⁹ Esta cepa fue proporcionada por el Dr. William H. Colledge y se ha mantenido durante varios años, en nuestras instalaciones, a partir de tres parejas parentales originarias. Se han abordado los experimentos comparando los resultados obtenidos de animales con genotipo $+/+$ o $+/-$ (grupo de ratones normales), con los obtenidos de animales con fibrosis quística, mutantes para *cftr*, con genotipo $-/-$ (grupo de ratones CF, carentes de CFTR). En los experimentos se utilizaron ratones macho y hembra indistintamente, con un peso comprendido entre 16 y 24 g. Con el fin de reducir la elevada mortalidad perinatal y juvenil de los animales $-/-$, provocada normalmente por obstrucción intestinal, estos recibieron una dieta libre de fibra (Special Diet Services) y, como bebida, una solución laxante, conteniendo polietilenglicol 8000 60 $g \cdot l^{-1}$, NaCl 1.5 $g \cdot l^{-1}$, KCl 7.5 $g \cdot l^{-1}$, NaHCO₃ 1.7 $g \cdot l^{-1}$, y Na₂SO₄ 5.2 $g \cdot l^{-1}$, en agua destilada.

- Ratas macho de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 250 g, que fueron distribuidas en los siguientes grupos experimentales:
 1. Animales a los que se les indujo pancreatitis aguda necrohemorrágica grave, según el método descrito por Aho *et al.*⁵ Los animales se anestesiaron por vía respiratoria con isoflurano (Isoba® vet), mediante un equipo de anestesia de gases para pequeños animales (Anesvet I-3300). Una vez anestesiado el animal, lo que se comprobó en todos los casos por la desaparición del reflejo óculo-palpebral, se practicó una laparotomía ventral media para acceder al paquete intestinal y se aisló y canuló el conducto pancreático principal en la parte más próxima al duodeno. En la zona cercana al hígado se ligó y canuló el conducto bilio-pancreático, desviando la bilis hacia el exterior y evitando que las sustancias infundidas a través del conducto pancreático alcanzasen el hígado. Tras la estabilización del animal, se procedió a la infusión retrógrada, a través del conducto pancreático principal, de 600 μl de taurocolato sódico a la concentración de 50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. En el caso del grupo control se infundió el mismo volumen de una solución de NaCl 150 mM. La infusión se realizó mediante una bomba de jeringa (KdScientific 789100B), durante 10 minutos. Una vez finalizado el procedimiento quirúrgico, la cavidad abdominal se mantuvo cerrada mediante una pinza, con el fin de evitar la pérdida de calor y de agua por evaporación. La temperatura del animal fue controlada y mantenida a $38 \pm 1^\circ\text{C}$ con ayuda de una fuente de calor. Los animales se sacrificaron, por sobredosis de anestesia, 1 hora después del inicio de la infusión retrógrada.
 2. Animales a los que se les indujo pancreatitis aguda de gravedad moderada, por administración de L-arginina, según el método inicialmente descrito por Tani *et al.*³⁴³ A los animales del grupo arginina se les administraron dos inyecciones intraperitoneales de $2.5 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de L-arginina, separadas por una hora.⁷² A los animales del grupo control se les administró el mismo volumen de NaCl 150 mM en los mismos tiempos. Estos animales se sacrificaron por dislocación cervical 24 horas después de la primera inyección.
 3. Animales a los que se les indujo pancreatitis aguda edematosa leve, mediante la hiperestimulación con ceruleína, según el método de Lampel & Kern.¹⁹⁹ La ceruleína se administró por vía subcutánea en 4 inyecciones sucesivas, a intervalos de 1 hora. La dosis utilizada fue de $20 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en cada inyección. Los animales de este grupo fueron

sacrificados por dislocación cervical 9 horas después de haberles sido administrada la primera inyección. Los resultados de este grupo (grupo ceruleína) fueron comparados con los de un grupo control, a los que se les inyectó el mismo volumen de NaCl 150 mM en los mismos tiempos.

2.1. Genotipaje de ratones de la cepa $Cftr^{tm1Cam}$

Extracción del DNA

El DNA, a partir del cual se determinó el genotipo de cada ratón, se obtuvo a partir de un fragmento del extremo de la cola del animal (0.5 cm aproximadamente), que se sometió a una digestión con $50 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de proteinasa K ($35 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) en una solución tampón de lisis (Trizma® base 100 mM, EDTA 5 mM y SDS $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 55°C durante 14-16 horas. Tras una centrifugación de 20 minutos a 16000 g se recogió, con ayuda de una micropipeta, el sobrenadante libre de proteínas, y por medio de una agitación suave se mezcló con isopropanol, formándose un ovillo flotante de DNA. Se lavó este material genético en un Eppendorf con etanol al 70% y, tras retirar el etanol, el DNA seco se disolvió en $200 \mu\text{l}$ de agua destilada, estéril y libre de DNAsas. Las muestras de DNA se conservaron a -20°C , y se diluyeron 10 veces con H_2O milli-Q inmediatamente antes de someterlas a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Determinación del genotipo mediante técnicas de PCR

El genotipo de los ratones que utilizamos viene determinado por un par de alelos: el alelo salvaje (+) y el alelo mutante (-). Este alelo mutante está modificado mediante etiquetado genético en células madre embrionarias para introducir un mini-gen *HPRT* en la secuencia codificante del gen *cftr* de ratón. Esta inserción introduce un codón de terminación en la secuencia codificante del *cftr*, para terminar prematuramente la proteína CFTR en el primer dominio de anclaje del nucleótido (Figura 1).

Los animales homocigóticos para la interrupción del gen *cftr* desarrollan fibrosis quística, presentando una serie de alteraciones tanto en el páncreas como en otros tejidos, consecuencia de la pérdida del canal aniónico CFTR.

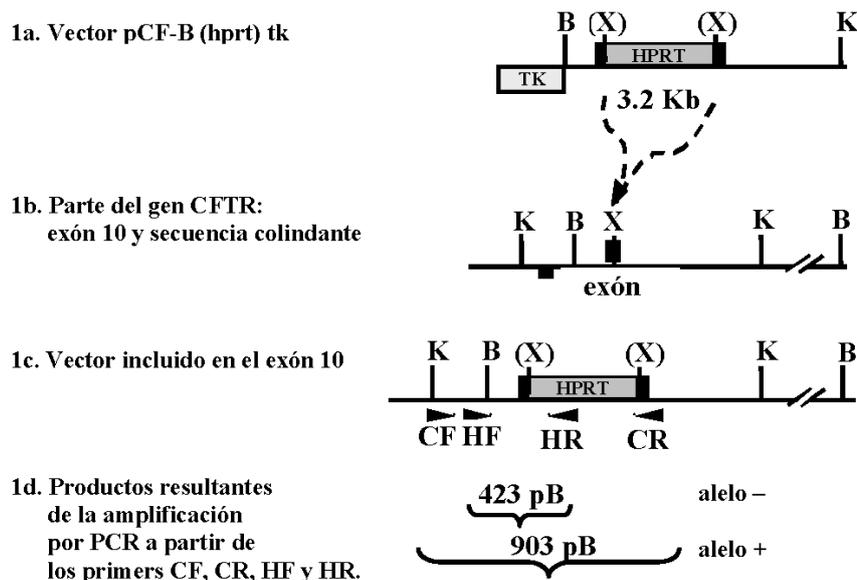


Figura 1: Estrategia de etiquetado del gen *cftr*. Tras la inserción del minigen *HPRT* en el gen *cftr* (1a-1c), se incluyen dos secuencias de nucleótidos de 903 y 423 pb (1d) que nos permitirán identificar a los alelos + y - del *cftr*. Tomado de Ratcliff *et al.*²⁶⁹

Mediante la técnica de PCR se amplificaron dos productos de cada muestra de DNA, para identificar cada uno de los alelos. Para ello, en lugar de llevar a cabo dos reacciones por separado, se utilizó un método mediante el cual se realizó una única reacción que amplificaba ambos productos al mismo tiempo (reacción PCR +/-).

En la reacción PCR +/- se utilizan dos combinaciones de oligonucleótidos diferentes, una para amplificar el alelo + (CFTRF, CFTRR) y otra para el alelo - (HPRTF, HPRTR); los oligonucleótidos del alelo + y el alelo - presentan la siguiente secuencia:

Oligonucleótidos del alelo +:

CFTRF: 5'-CCT GAT GTT GAT TTT GGG AGA A-3'

CFTRR: 5'-TTT GGT TTG TTA GTT TTT AGC A-3'

Oligonucleótidos del alelo -:

HPRTF: 5'-CAT TCC CAG CGT CGT GAT TA-3'

HPRTR: 5'-GTT TGC ATT TA CCA GTG T-3'

Los productos resultantes de cada reacción, correspondientes al alelo + y al alelo -, tienen 903 y 423 pares de bases, respectivamente.

Así, a los ratones que presentaron únicamente producto del alelo + (homocigóticos salvajes) les correspondió un genotipo +/+, a los que presentaron solo producto del alelo - (homocigóticos mutantes) un genotipo -/-, y los que presentaron ambos productos (heterocigóticos) un genotipo +/- (Figura 2). Los ratones con un genotipo +/- o +/- se utilizaron como controles, formando el grupo de ratones normales, al no haberse detectado ningún tipo de diferencia entre la funcionalidad de los conductos pancreáticos de homocigóticos salvajes y de heterocigóticos;²⁵⁶ aquellos que poseían un genotipo -/-, mutantes para *cftr* y que desarrollan fibrosis quística, se incluyeron en el grupo de ratones CF.

Para realizar la reacción de la PCR +/- se preparó una mezcla de reactivos en un tubo Eppendorf, de acuerdo con la siguiente tabla:

Reactivo	Stock	$\mu\text{l}/\text{tubo}$
H ₂ O libre de DNA		9.4
MgCl ₂	1 mM	2
CFTRF	5 μM	1.3
CFTRR	5 μM	1.3
HPRTF	5 μM	0.5
HPRTR	5 μM	0.5
KAPA Taq ReadyMix		25
○ MgCl ₂	1.5 mM	
○ dNTPs	0.2 mM	
○ Kapa Taq	0.05 U· μl^{-1}	
Total		40

Se mezclaron bien todos los componentes invirtiendo suavemente el Eppendorf y, de esta mezcla, se añadieron 40 μl a 10 μl de muestra. Se hizo también un control negativo, en el que en lugar de 10 μl de muestra se utilizaron 10 μl de agua milli-Q. Por lo tanto, el volumen final del tubo fue siempre de 50 μl .

Los tubos con la mezcla y la muestra se colocaron en un termociclador (Gene Amp® PCR System 2700) y se sometieron al siguiente protocolo de reacción:

94°C	5 minutos	} x 40 ciclos
93°C	30 segundos	
58°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	
4°C	-----	

Electroforesis

Tras la amplificación, las muestras de DNA se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se preparó 1 litro de TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) añadiendo 25 ml de buffer 50x TAE a 975 ml de agua destilada. El gel de agarosa se preparó añadiendo 1.8 g de agarosa a 100 ml de TAE; la mezcla se calentó durante unos minutos hasta que la agarosa quedó completamente disuelta y acto seguido se añadieron 6 μ l del fluoróforo bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), el cual incrementa considerablemente su fluorescencia cuando está unido a la doble hélice de DNA.

Para cargar el gel se mezcló cada muestra de DNA con 2 μ l de solución tampón de carga (azul de bromofenol $2.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, xilene cianol FF $2.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, glicerol 30%). La electroforesis de las muestras se realizó en una cubeta (Genotek), conectada a una fuente de alimentación (Power Pac Basic TM, Bio-Rad 041BR), a 80 V durante 110 minutos. Cada porción de DNA amplificada, correspondiente a cada uno de los alelos, se visualizó como una banda en el gel de electroforesis; para ello se observó el gel iluminándolo a una λ de 254 nm. Comparando el resultado con un marcador de tamaños, se pueden identificar las bandas correspondientes a los alelos + y -; la banda + se sitúa en torno a las 900 pb y la banda - alrededor de las 400 pb (Figura 2).

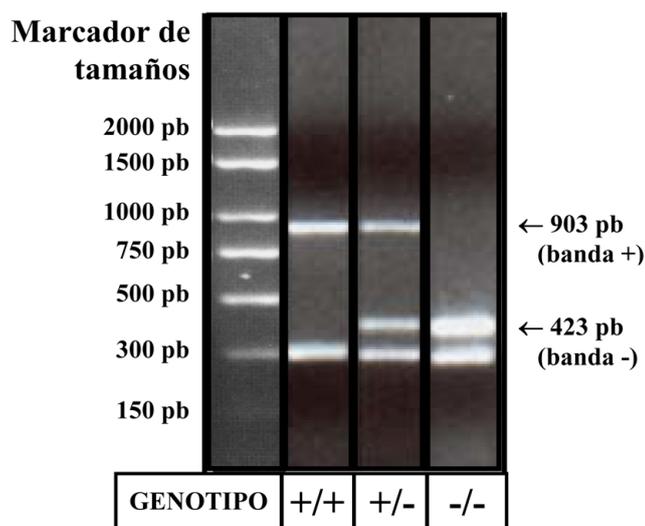


Figura 2: Gel de agarosa que muestra el resultado de la extracción del DNA, PCR y electroforesis. Las muestras cuyo resultado mostraron solo banda (+) determinaban un genotipo +/+, las que mostraron solo banda (-) un genotipo -/-, y aquellas en las que aparecían bandas (+) y (-) indicaban un genotipo +/-.

3. CONTROL HISTOLÓGICO DE LA GRAVEDAD DE LA PANCREATITIS AGUDA

Para la realización de estudios histológicos del páncreas de ratas de cada uno de los grupos experimentales (taurocolato, arginina, ceruleína y sus respectivos controles), se procedió a anestésiar al animal con éter etílico (excepto en el grupo taurocolato, en el que el animal ya estaba anestesiado con isoflurano). Una vez anestesiado el animal, lo que se comprobó en todos los casos por la desaparición del reflejo óculo-palpebral, se abrió la caja torácica para dejar al descubierto el corazón. Tras realizar un corte en este, se perfundieron, a través de la aorta, 100 ml de NaCl 150 mM con heparina al 0.03% y, posteriormente, 300 ml de paraformaldehído al 4% en PBS (0.15 M, pH 7.2). Se extrajo el páncreas y se depositó en la misma solución fijadora a 4°C durante 24 horas. Después de esta post-fijación el páncreas se mantuvo 24 h en una solución de sacarosa al 20% y a continuación en sacarosa al 30% a 4°C, para crioprotegerlo. Finalmente, tras la congelación del tejido, se realizaron cortes de 20-30 μm de espesor en un criostato. Las secciones se montaron sobre portas gelatinizados y se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina con el fin de evaluar la presencia de alteraciones patológicas en el páncreas de los distintos grupos de animales.

4. ESTUDIOS EN CONDUCTOS PANCREÁTICOS AISLADOS

4.1. Aislamiento y cultivo de conductos pancreáticos

Preparación del tejido pancreático

Para aislar y poner en cultivo conductos pancreáticos de ratón o de rata se siguió el método descrito para el cobaya por Ishiguro *et al.*,¹⁵⁴ con las modificaciones descritas por Fernández-Salazar *et al.*⁹¹

Se utilizaron una rata o dos ratones en cada experimento; todo el material empleado en este procedimiento fue estéril. Se sacrificaron los animales por dislocación cervical, se colocaron en posición decúbito lateral derecho y se rociaron con etanol al 70% para evitar contaminaciones. Se utilizó material quirúrgico para abrir lateralmente el abdomen y extraer el páncreas, que se depositó en una placa Petri, a la que se añadieron 2 ml de DMEM con una jeringa. Se limpió el órgano de tejido extrapancreático y se traspasó a otra placa Petri en la que se inyectó su intersticio con 2 ml de solución enzimática filtrada (colagenasa CLSPA 40 U·ml⁻¹, hialuronidasa tipo IV-S 400 U·ml⁻¹, SBTI 0.2 mg·ml⁻¹ y BSA 2 mg·ml⁻¹ en DMEM). El páncreas y los restos de la solución enzimática fueron traspasados desde la placa Petri a un Erlenmeyer con tapón y se añadieron 3 ml más de la misma solución enzimática. Con unas tijeras se cortó el páncreas en fragmentos, se gaseó el tejido con 5% CO₂ - 95% O₂ y se incubó en un baño a 37°C con agitación suave durante 15 minutos.

Tras esta primera incubación, se hizo pasar el tejido varias veces a través de una pipeta Pasteur de vidrio con la punta rota, de forma que tuviera una abertura mayor; se retiró la solución enzimática y se reemplazó por otros 5 ml de la misma solución. Se volvió a gasear el tejido con 5% CO₂ - 95% O₂ y se incubó en el baño con agitación suave durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se traspasó el tejido del Erlenmeyer a un tubo de plástico. Tras dejar que el tejido se depositase en el fondo del tubo, se retiró la solución de enzima y se realizaron 4 lavados con aproximadamente 4 ml de DMEM cada uno. El tubo se agitó para que el tejido se desprendiera del fondo y los lavados fueran efectivos. Se realizó un último lavado con 3 ml de solución de almacenamiento (SBTI 0.2 mg·ml⁻¹ y BSA 30 mg·ml⁻¹ en DMEM)

esterilizada mediante filtración y, por último, se mantuvo el tejido en 4 ml de dicha solución de almacenamiento y en hielo para su conservación.

Microdissección del tejido pancreático

Antes de comenzar con la disección se roció la zona de trabajo con etanol al 70% para evitar contaminaciones. Se limpiaron también con etanol el portaobjetos y el pocillo utilizados en la disección. Se llenó el pocillo con unas gotas de solución de almacenamiento y se recubrió con aceite mineral, para evitar la evaporación de la solución y la posible contaminación de los conductos pancreáticos transferidos a este pocillo.

Con una pipeta Pasteur estéril se pasó parte del tejido del tubo al porta, dejando el resto de tejido en el tubo y en hielo. Una vez hecho esto, se procedió a la disección del tejido bajo una lupa binocular (MZ6, Leica) y una fuente de luz fría (CLS 150, Leica), utilizando dos agujas de insulina estériles montadas sobre jeringas de 1 ml. Una vez localizado un conducto pancreático se limpió todo lo posible, con cuidado de no romperlo, retirando las células acinares y los vasos sanguíneos que suelen estar adheridos a él. Una vez aislado, se cortó en trozos con una longitud de aproximadamente 4 veces su anchura.

Cultivo de conductos pancreáticos aislados

Los fragmentos del conducto se traspasaron con ayuda de una micropipeta (fabricada alargando la punta de una pipeta Pasteur de vidrio al calor de la llama) a la solución contenida en el pocillo. La micropipeta, conectada en el otro extremo con un tubo de goma acabado en una boquilla, permitió, aspirando y soplando, traspasar los fragmentos desde el porta de disección al pocillo. Cada vez que se transfirieron los conductos, la punta de la micropipeta se limpió con etanol al 70%, se aclaró un par de veces con DMEM y, finalmente, con solución de almacenamiento.

Cuando hubo un número considerable de fragmentos en el pocillo se transfirieron a una placa Petri con 3 ml de medio de cultivo (SBTI 0.15 mg·ml⁻¹, L-glutamina 4 mM, FBS 10%, insulina humana 0.1 U·ml⁻¹, dexametasona 2 µg·ml⁻¹, penicilina 10 U·ml⁻¹ y estreptomycinina 10 µg·ml⁻¹ en

McCoy's 5A). Se repitió la misma operación hasta acabar el tejido. Los conductos se incubaron en medio de cultivo, a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5%, durante toda la noche.

Durante el cultivo, los extremos de muchos de los fragmentos se sellan espontáneamente, dando lugar a un espacio luminal cerrado, como muestra la figura 3, en la que se observa un fragmento de conducto pancreático tras 16 horas en cultivo.

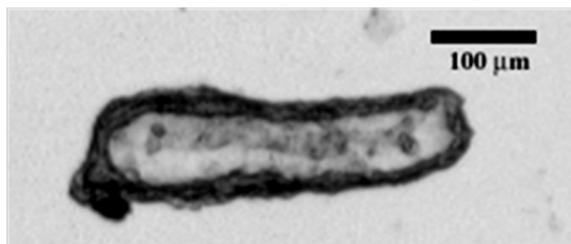


Figura 3: Fragmento de conducto pancreático de ratón. Imagen tomada con un microscopio invertido tras el cultivo del conducto durante la noche.

Los conductos pancreáticos aislados se utilizaron en dos tipos de estudios, que se detallarán a continuación:

- 1) Medida de la secreción ductular por videomicroscopía.
- 2) Medida del pH intracelular (pH_i) en células ductulares.

4.2. Medida de la secreción ductular por videomicroscopía

Medida de la secreción

El análisis de la secreción de fluido en conductos pancreáticos aislados de ratón y de rata se realizó mediante la técnica de videomicroscopía digital, puesta a punto por Steward *et al.*³²⁵ y modificada por Fernández-Salazar *et al.*⁹¹ Esta técnica se basa en el análisis del aumento de volumen de los fragmentos de conducto, ya que estos se hinchan, al tener el espacio luminal cerrado, como consecuencia de la secreción. De esta forma, el incremento en el área de proyección luminal de los conductos refleja la secreción producida.

Varios conductos, con un espacio luminal claramente identificable, se transfirieron con ayuda de la micropipeta a una cámara de perfusión, cuya base, un porta sellado a la cámara, fue tratada en su parte interna con Cell-Tak™; esta sustancia contiene una proteína aislada del pie de los mejillones, que permite la adhesión de los conductos. La cámara de perfusión se situó en un microscopio invertido (DM IRB, Leica) equipado con una cámara CCD (902A, Watec Corp.) y conectado con un ordenador a través de una tarjeta digitalizadora de imágenes (LG-3, Scion Corp.). La cámara de perfusión estaba termostataada, de forma que se mantuvo la temperatura del líquido de perfusión a 37°C (TC-34 Heater Controller, Warner Instrument Corp.). La perfusión se llevó a cabo a partir de varias jeringas, por gravedad, a una velocidad de aproximadamente 1.5 ml·min⁻¹.

En cada experimento se pegaron varios conductos a la base de la cámara, se enfocaron utilizando un objetivo 4x (Leica), y se perfundieron todos al mismo tiempo. Con el programa Scion Image, y con la ayuda de una serie de *macros* programadas al efecto, se tomaron imágenes seriadas de los conductos, a intervalos de tiempo de un minuto. Estas imágenes quedan almacenadas en una *stack*, en formato TIFF, que contiene todos los conductos que se perfunden juntos en el mismo experimento. En un primer paso, la serie de imágenes de cada experimento se separó en series de imágenes de cada conducto; para ello, se definió manualmente un área de interés, conteniendo las imágenes de ese conducto concreto y, mediante instrucciones incluidas en la *macro*, se generó una *stack* de menor tamaño, conteniendo las imágenes de ese conducto.

A continuación las imágenes, en escala de grises (Figura 4A), se transformaron en imágenes binarias, seleccionando un umbral de intensidad, que típicamente fue de 40/256 (Figura 4B). Mediante un análisis ejecutado por la *macro*, se identificaron imágenes de partículas de un tamaño mínimo y se calculó su área (Figura 4C). Se utilizó un factor de transformación que permitió la conversión de los *pixels* en unidades de longitud (μm); este factor se obtuvo tras la calibración con una cámara Thoma y se introdujo en la *macro* para facilitar el cálculo del área de las imágenes.

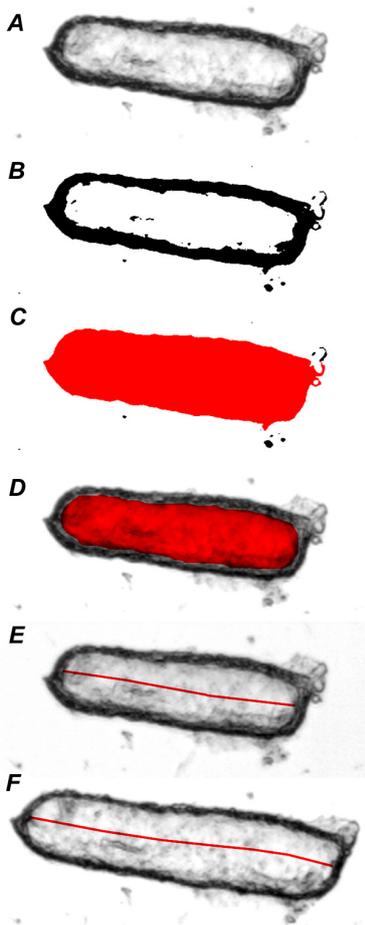


Fig 4: *A.* Imagen en escala de grises de un fragmento de un conducto pancreático al principio del experimento. *B.* La misma imagen convertida a modo binario (blanco/negro) usando un valor umbral estándar (40/256), después de un procedimiento de sustracción del fondo. *C.* Área total de la imagen binaria mostrada en *B*, calculada automáticamente por el *software* Scion Image. *D.* Área luminal, definida manualmente, en la misma imagen. El área mostrada en *C*, menos la mostrada en *D*, da como resultado el valor del área total de la pared del conducto, que se resta automáticamente de todas las imágenes de la serie. *E.* Medida manual de la longitud del espacio luminal en la primera imagen de la *stack*, usando la herramienta de "línea segmentada" del Scion Image. *F.* Medida manual de la longitud del espacio luminal en la imagen que difiere más de la primera; esta imagen es seleccionada automáticamente por el programa, de acuerdo con las instrucciones de la *macro*.

Así, para cada minuto, obtuvimos el área de proyección total del conducto, delimitada por su perímetro externo, incluyendo por tanto la pared del conducto. Para calibrar la contribución de la pared del conducto a este área total, se midió manualmente el área de proyección luminal en la primera imagen del conducto, utilizando una tableta gráfica (Artap II, Wacon GMBH), como se muestra en la figura 4D, y se asumió que el área de proyección de la pared del conducto (área 4C - área 4D) no se alteraba durante el experimento. Mediante la *macro* se

restó automáticamente este valor a los valores de área total de cada imagen del conducto, obteniendo el área de proyección luminal en cada minuto de experimento.

Para cálculos posteriores se necesita saber cómo crece cada conducto: en qué medida crece a lo largo y/o ancho; para ello, se midió la longitud del eje mayor del área luminal de la primera imagen y de la imagen más diferente a esta primera (seleccionada automáticamente por la *macro*), como se muestra en las imágenes *E* y *F* de la figura 4.

Cálculo del volumen luminal relativo

La secreción del conducto conlleva un incremento en el volumen luminal. Con el tratamiento de imágenes se pueden medir los valores del área de proyección luminal a lo largo del experimento (A); estos valores se normalizaron respecto al área de proyección luminal inicial (A_0), obteniéndose los valores de área luminal relativa ($A_R = A \cdot A_0^{-1}$). Para transformar estos valores en volumen luminal relativo (V_R) se asumió una geometría cilíndrica del lumen del conducto, caracterizada por su longitud (l) y su radio (r). El área de proyección (A) y el volumen del espacio luminal (V) serán:

$$A = 2rl$$

$$V = \pi r^2 l = \frac{\pi A^2}{4l} \quad (1)$$

Por tanto, el área luminal relativa y el volumen luminal relativo serán:

$$A_R = \frac{A}{A_0} = \frac{rl}{r_0 l_0}$$

$$V_R = \frac{V}{V_0} = \frac{r^2 l}{r_0^2 l_0}$$

Si el conducto se expandiera solo en longitud y nada en anchura, entonces:

$$\frac{r}{r_0} = 1$$

$$V_R = \frac{l}{l_0} = A_R$$

Si por el contrario, el conducto se expandiera solamente en anchura y nada en longitud, el volumen relativo sería:

$$\frac{l}{l_0} = 1$$

$$V_R = \left(\frac{r}{r_0}\right)^2 = A_R^2$$

Si el incremento fuera en anchura y longitud en la misma proporción, el volumen relativo sería:

$$\frac{l}{l_0} = \frac{r}{r_0}$$

$$V_R = \left(\frac{r}{r_0}\right)^3 = A_R^{1.5}$$

Dado que los conductos se hinchan en ambas direcciones de forma variable, la ecuación general introduce una variable k .

$$V_R = A_R^k \tag{2}$$

Para obtener el valor apropiado de k para cada conducto se midieron el área y la longitud luminal de la primera imagen de la serie (A_0 y l_0), así como el área y la longitud luminal de la imagen que reflejaba el mayor cambio en el área del conducto respecto a la imagen inicial (A_n y l_n). A partir de la ecuación (1) se obtuvo el volumen luminal relativo del conducto en dicha imagen:

$$\frac{V_n}{V_0} = \frac{(A_n / A_0)^k}{l_n / l_0} \tag{3}$$

Despejando k en la ecuación (2):

$$k = \frac{\log(V_n / V_0)}{\log(A_n / A_0)} \quad (4)$$

Sustituyendo, en esta ecuación (4), el volumen relativo por su valor en la ecuación (3), se obtuvo una fórmula para k cuyo valor viene dado por el área y la longitud del espacio luminal en la imagen inicial y en aquella con mayor cambio.

$$k = 2 - \frac{\log(l_n / l_0)}{\log(A_n / A_0)}$$

Conocido el valor de k se pueden transformar todos los valores del área relativa en volúmenes relativos según la ecuación (2), asumiendo que el incremento del espacio luminal en anchura (Δr) y longitud (Δl) se mantienen en una proporción fija a lo largo del experimento.

Cálculo de la tasa de secreción

La secreción del conducto también se midió como tasa secretora, referida a la superficie del epitelio del conducto, y expresada en $\text{pl} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$.

El flujo de fluido hacia el lumen de un segmento de conducto pancreático se calculó a partir del cambio del volumen luminal a lo largo del experimento; siendo $V = V_R \cdot V_0$, el flujo será:

$$\frac{dV}{dt} = V_0 \frac{dV_R}{dt} \quad (5)$$

Donde V_0 se podrá expresar en función del área inicial (A_0) y longitud inicial (l_0) al aplicar la ecuación (1):

$$V_0 = \frac{\pi A_0^2}{4l_0} \quad (6)$$

La tasa de secreción se expresa como flujo por unidad de área de epitelio. Dado que la razón $l \cdot r^{-1}$ fue alta en los fragmentos de conductos, y con el fin de simplificar el procedimiento, la superficie de los extremos se despreció en el cálculo de dicha área epitelial (E):

$$E = 2\pi r_0 l_0 = \pi A_0 \quad (7)$$

Aplicando las ecuaciones (5), (6) y (7) se obtuvo la siguiente ecuación para la tasa secretora por unidad de superficie epitelial (J_v), en función del área y longitud lumenales iniciales, así como de la tasa de cambio del volumen relativo.

$$J_v = \frac{A_0}{4l_0} \cdot \frac{dV_R}{dt}$$

Soluciones de perfusión

Una vez pegados a la base de la cámara de perfusión, los fragmentos de conductos se perfundieron con tres tipos de soluciones:

- Solución libre de HCO_3^- , a la que llamamos solución HEPES, que estaba compuesta por NaCl 130 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM, D-Glc 10 mM, y HEPES 10 mM; el pH fue ajustado a 7.4 con NaOH.
- Solución HCO_3^- , de igual osmolaridad, cuya composición fue NaCl 115 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM, D-Glc 10 mM y NaHCO_3 25 mM (pH 7.4).
- Solución hipotónica (solución HEPES diluida un 30% con agua destilada).

Estas soluciones se prepararon cada día antes de realizar los experimentos. La solución HEPES y la solución HCO_3^- se mantuvieron en un baño a 37°C y se gasearon continuamente, la solución HEPES con 100% O_2 y la solución HCO_3^- con 5% CO_2 - 95% O_2 . Se mantuvieron ambas tapadas para minimizar la evaporación y los consiguientes cambios de osmolaridad.

Se añadieron a dichas soluciones los agonistas de la secreción y los diversos bloqueantes de transportadores, utilizados en el tiempo de experimento y a las concentraciones que se detallarán en el apartado de *Resultados y Discusión*. Algunas de estas sustancias químicas, al no ser solubles en agua, se prepararon utilizando DMSO como disolvente inicial; la concentración final de DMSO en las soluciones de perfusión no superó en ningún caso el 0.3% (v/v).

Protocolos experimentales

Los experimentos de análisis de la secreción ductular tuvieron una duración de 45 o 65 minutos. Antes de iniciar los experimentos, los conductos se mantuvieron un mínimo de 30 minutos en solución HEPES, en hielo y, para su equilibrado, se perfundieron siempre un mínimo de 5 minutos con esta misma solución, es decir, en ausencia de HCO_3^- , antes de comenzar la adquisición de imágenes del experimento. Los protocolos experimentales concretos que se utilizaron en cada caso se detallarán en el apartado de *Resultados y Discusión*.

En todos los casos, durante los 5 últimos minutos los conductos se perfundieron con la solución hipotónica, que sirvió como control positivo de la integridad de cada conducto, ya que al ser perfundidos con esta solución los fragmentos de conducto con un espacio luminal bien cerrado se hinchan por un efecto osmótico. Aquellos conductos que no respondieron a esta solución hipotónica con un incremento del área luminal en los minutos finales del experimento se excluyeron del estudio.

Análisis estadístico

Los resultados de volumen luminal relativo de cada conducto se recogieron en intervalos de 1 minuto, mientras que los de tasa secretora se expresaron como las medias por intervalos de 5 minutos, eligiendo en cada protocolo experimental una serie de periodos representativos de las distintas condiciones experimentales. A partir de estos valores se calculó la media y el error estándar de la media (S.E.M.) para ambos parámetros y en cada grupo experimental.

La comparación estadística de los datos relativos a la tasa secretora se realizó mediante el test de la *t* de Student cuando se compararon solo dos grupos y mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para más de dos grupos, utilizando el test de Scheffé para analizar las diferencias por pares cuando el ANOVA resultó significativo.

También se utilizó el test de la *t* de Student cuando se necesitó analizar si el valor medio de la tasa secretora en una situación experimental concreta era significativamente diferente de 0.

Las diferencias se consideraron significativas cuando *P* fue menor de 0.05.

4.3. Medida del pH intracelular en células ductulares

Medida del pH_i

La medida del pH_i se realizó en células ductulares pancreáticas de ratas del grupo ceruleína y su correspondiente grupo control. El método utilizado se basa en la técnica de microfluorimetría, inicialmente descrita en 1982 por Rink *et al.*,²⁷⁴ y utilizada en conductos pancreáticos de cobaya por Ishiguro *et al.*¹⁵⁴ Esta técnica se basa en la carga de las células ductulares con un indicador fluorescente, el BCECF, cuya excitación es dependiente del pH. De esta forma, el registro de la fluorescencia emitida por las células mientras el conducto es perfundido con determinadas soluciones, agonistas y bloqueantes, se puede transformar en valores de pH_i.

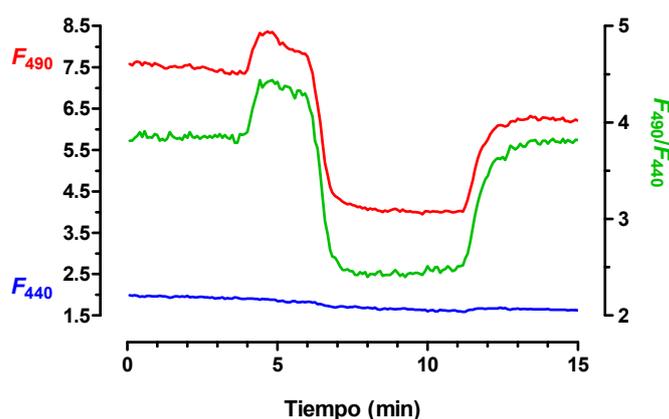


Figura 5: Registro de la fluorescencia emitida a lo largo del tiempo a 530 nm por una célula ductular pancreática cargada con BCECF e iluminada con una λ de 490 nm (F_{490}) y 440 nm (F_{440}). A partir de estos valores se puede calcular la ratio F_{490}/F_{440} que, como se describe más adelante, puede transformarse en valores de pH_i.

Las células cargadas con BCECF emiten fluorescencia a un máximo de alrededor de 530 nm. Cuando estas células se iluminan a 490 nm, la fluorescencia emitida por el BCECF es proporcional al pH_i; sin embargo, el BCECF se va degradando por efecto de la luz y puede salir lentamente de la célula, por lo que es necesario realizar un registro iluminando los conductos con una longitud de onda (440 nm) a la cual la fluorescencia emitida no depende del pH, sino de la cantidad de fluoróforo que hay en la célula. Al calcular la ratio de fluorescencia emitida a

estas dos longitudes de onda de excitación diferentes, o cociente de las fluorescencias F_{490}/F_{440} , evitamos el error provocado por la caída de la señal, causada por la pérdida progresiva del BCECF (Figura 5).

Los conductos con un espacio luminal claramente identificable se incubaron en una placa Petri en presencia del acetoximetil éster del BCECF (BCECF-AM) a una concentración final de $2 \mu\text{M}$ en solución HEPES, durante 15 minutos, en oscuridad y a temperatura ambiente. El BCECF-AM se disolvió inicialmente en DMSO hasta una concentración de 2 mM. Este derivado del BCECF no tiene color ni fluorescencia, atraviesa fácilmente la membrana plasmática y, en el citoplasma, mediante una reacción catalizada por esterasas citoplasmáticas, se transforma en BCECF, que es retenido en la célula y emite fluorescencia. Tras esta incubación con el fluoróforo, los conductos pancreáticos se mantuvieron en hielo y en oscuridad hasta su utilización. Los experimentos se llevaron a cabo como máximo en las dos horas y media siguientes a la carga con BCECF.

Se transfirió un solo conducto a una cámara de perfusión, tratada en su base con Cell-Tak™ para que el conducto permaneciese pegado al fondo, y termostatada, para mantener la temperatura del líquido de perfusión a 37°C (TC-34 Heater Controller, Warner Instrument Corp.). La perfusión de la cámara se llevó a cabo por medio de una bomba peristáltica, a una velocidad constante de $1.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La cámara de perfusión se situó en un microscopio invertido (Nikon DIAPHOT) equipado con una lámpara de epifluorescencia de xenón (Nikon, Xenon Lamp Power Supply XPS-10) y una cámara CCD (902A, Watec Corp.).

Una región del epitelio ductal se enfocó con un objetivo de inmersión 40x (Nikon), utilizando aceite de inmersión libre de fluorescencia, y se iluminó alternativamente con longitudes de onda de 440 y 490 nm, seleccionadas mediante un sistema intercambiador de filtros (Lambda 10-2, Sutter Instrument Company).

La señal fluorescente emitida a 530 nm por el BCECF al ser iluminado a 440 y 490 nm se detectó y cuantificó en un fotomultiplicador (Cairn Research Ltd.). Esta señal se procesó con un amplificador (Integra, Cairn Research Ltd.) y se envió a un ordenador, equipado con una tarjeta de adquisición de datos (Das1000, Measurement Computing). Todo el equipo se controló desde el ordenador por medio del *software* DASyLab v.7.0004, programado para que

el conducto reciba la iluminación a 440 y 490 nm durante 1 segundo cada una de ellas, con un intervalo de ausencia de iluminación intermedio de 3 segundos. Este *software* se encargó también de almacenar en el ordenador los datos de fluorescencia registrados a lo largo del tiempo.

Calibración

La calibración de la respuesta fluorescente del indicador de pH, BCECF, se llevó a cabo mediante la técnica de la nigericina en presencia de altas concentraciones del ion K^+ .³⁴⁷ La nigericina es un ionóforo que intercambia H^+ por otro catión, principalmente K^+ , aunque también Na^+ , a través de las membranas celulares. Exponiendo las células a una solución que contiene altas concentraciones de K^+ y nigericina, y en ausencia de Na^+ , el ionóforo intercambiará H^+ por K^+ ; así los gradientes a través de la membrana se igualan, siendo el pH_i igual al pH extracelular.

La composición de la solución empleada para perfundir los conductos en estos experimentos de calibración del pH_i fue: KCl 135 mM, HEPES 10 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM y nigericina 5 μ M, y se preparó a cuatro pH diferentes 7.8, 7.4, 7 y 6.6, ajustados con KOH. Todas las soluciones se gasearon con 100% O_2 . La nigericina se disolvió inicialmente en etanol absoluto a una concentración de 5 mM.

Los conductos se perfundieron con HEPES durante al menos 5 minutos y a continuación con las soluciones de calibración, bien en sentido ascendente o descendente de pH. La perfusión se realizó, durante varios minutos, con cada una de estas soluciones, hasta que se mantuvo constante el valor de fluorescencia. Se calculó la media de la fluorescencia emitida a 530 nm, a ambas longitudes de onda de excitación, durante 1 minuto, cuando esta ya era estable a cada pH ensayado. A partir de los valores de la ratio de fluorescencia obtenidos en cada conducto para cada uno de los valores de pH ensayados (Figura 6) se calculó la ecuación de la recta de regresión que relaciona la ratio F_{490}/F_{440} con el pH_i (Figura 7).

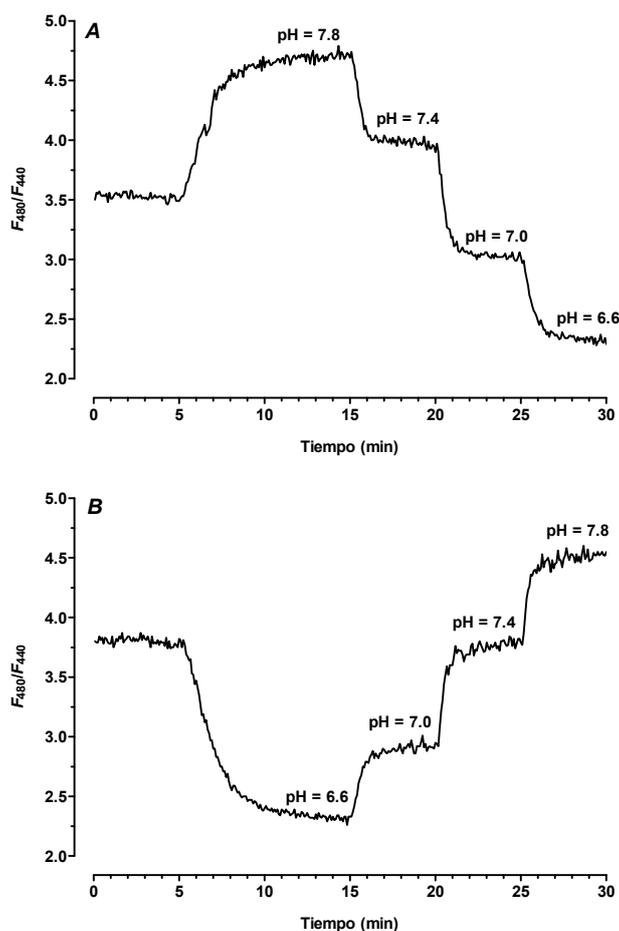


Figura 6: Registro de dos conductos sometidos al protocolo de calibración con las soluciones de perfusión aplicadas en orden descendente (A) o ascendente (B) de pH.

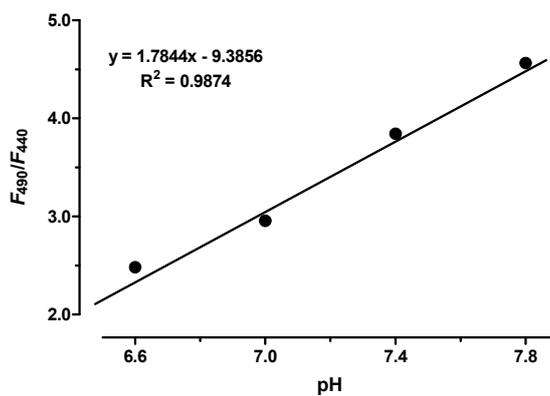


Figura 7: Recta de regresión obtenida a partir de los valores de fluorescencia emitidos al perfundir los conductos en presencia de nigericina y altas concentraciones de K^+ en soluciones de pH conocido.

Soluciones de perfusión

Se utilizaron tres tipos de soluciones para cada protocolo experimental:

- Solución HCO_3^- , cuya composición ya se ha descrito en los experimentos de análisis de la secreción de fluido.
- Solución HCO_3^- con NH_4^+ : solución HCO_3^- a la que se añadió NH_4Cl 20 mM, retirando 20 mM de NaCl (95 mM en esta solución) para no variar la osmolaridad.
- Solución HCO_3^- sin Na^+ : solución HCO_3^- en la que el Na^+ se sustituyó por *N*-metil-D-glucamina (NMDG^+), y cuya composición final fue NMDG-Cl 115 mM, NMDG-HCO_3 25 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM, *D*-Glc 10 mM, pH 7.4. El NMDG-Cl se preparó inicialmente como una solución 1 M, incorporando 84 ml de HCl comercial a 1 l de NMDG 1 M. Para preparar NMDG-HCO_3 1 M, se gaseó durante toda la noche NMDG 1 M con 100% CO_2 a temperatura ambiente.

La solución HEPES, cuya composición ya se ha especificado, se utilizó únicamente para la incubación de los conductos con BCECF-AM.

Según el protocolo experimental, a estas soluciones se les añadieron diversos bloqueantes de transportadores de membrana y/o el agonista forskolina, a la concentración de 5 μM .

Protocolos experimentales

Los protocolos experimentales llevados a cabo en los estudios para la medida del pH_i utilizan únicamente solución HCO_3^- y en todos los casos el conducto fue sometido a un pulso de NH_4^+ . La duración de los experimentos fue de 15 minutos.

En todos los experimentos, tras 4 minutos de perfusión con solución HCO_3^- , se sometió al conducto a un pulso de NH_4^+ 20 mM, de 2 minutos de duración, maniobra que provocó la acidificación del citoplasma. Como se refleja en la figura 8, la presencia de NH_4^+ en el baño produjo la entrada en la célula de NH_3 , para el que la membrana es mucho más permeable que para el NH_4^+ , lo que provocó una alcalinización, ya que se retiraron los H^+ al reaccionar con el NH_3 . En el minuto 6 de experimento, la retirada del NH_4^+ del medio provocó la acidificación

del citoplasma al favorecerse la reacción en el sentido de formación de H^+ y de NH_3 , saliendo este último de la célula, como se muestra en el segundo panel de la figura 8.

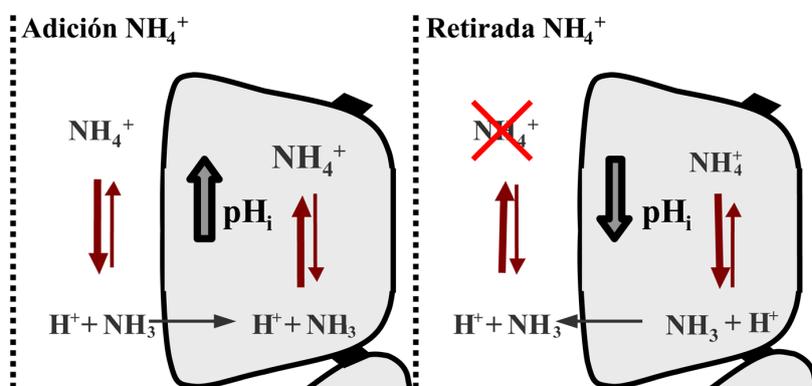


Figura 8: Cambios en el pH_i producidos como consecuencia de la exposición de la célula a NH_4^+ y de su posterior retirada del medio de perfusión.

Tras este pulso de NH_4^+ se perfundió el conducto durante 5 minutos con un medio libre de Na^+ , que fue sustituido por el catión $NMDG^+$. Por último, se perfundió 4 minutos con el medio inicial (solución HCO_3^-).

Los bloqueantes cuyos efectos se estudiaron (bumetanida, H_2DIDS y EIPA) se añadieron a partir del minuto 6 del experimento y hasta el final del mismo. El único agonista de la secreción utilizado (forskolina) estuvo presente, en su caso, durante todo el experimento. Los protocolos concretos utilizados se describirán con detalle en el apartado de *Resultados y Discusión*.

Análisis estadístico

Los valores de pH_i se calcularon a partir de los valores de fluorescencia emitida, aplicando la ecuación de la recta de regresión obtenida en los experimentos de calibración.

A partir de estos valores de pH_i , se calculó la pendiente de recuperación del pH_i (unidades de $pH \cdot \text{min}^{-1}$) tras la carga ácida y la perfusión en ausencia de Na^+ , tomando los valores de pH_i de los primeros 30 segundos de recuperación del pH_i . Se calcularon las medias de estas pendientes y los errores estándar de la media (S.E.M.) en cada grupo experimental.

También se calcularon las diferencias entre los valores de pH_i al inicio y al final del experimento, es decir, las unidades de pH no recuperadas tras los diversos protocolos experimentales. También en este caso se calculó la media y el S.E.M. en cada grupo.

La comparación estadística de los valores de las pendientes de recuperación del pH_i y de las diferencias entre los valores iniciales y finales se realizó mediante el test de la *t* de Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando *P* fue menor de 0.05.

5. ESTUDIOS EN CÉLULAS DUCTULARES PANCREÁTICAS AISLADAS

5.1. Aislamiento de células ductulares pancreáticas

Los animales utilizados en estos estudios fueron ratones del grupo CF, con su correspondiente grupo control.

Tras el aislamiento y cultivo de los conductos pancreáticos, de la manera anteriormente descrita, los conductos se traspasaron a una placa Petri con 3 ml de DMEM conteniendo 50 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ de elastasa. Esta placa se mantuvo durante una hora en un incubador a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% con el fin de que la elastasa hidrolizara las fibras de elastina que quedan en la pared del conducto, haciendo posible el aislamiento de células individuales.

Una vez incubados con la enzima, los conductos se pasaron con la micropipeta a otra placa que contenía una solución libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (NaCl 140 mM, D-Glc 5 mM, HEPES 10 mM, EGTA 2 mM, pH 7.4) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La incubación en ausencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} tiene como objeto debilitar las uniones intercelulares para facilitar posteriormente la obtención de células ductulares.

A continuación se pasó cada conducto, junto con un pequeño volumen de solución libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , a un cubre y con la ayuda de dos agujas de insulina se rompió, consiguiendo que las células ductulares se soltaran. Tras esta acción, se dejó reposar durante 5 minutos para que la mayor parte de las células cayesen y quedasen pegadas a la superficie del cubre.

Por último, se sumergió el cubre en una placa Petri que contenía 2 ml de NaCl 140 mM, D-Glc 5 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7.4, y se mantuvo en hielo hasta el momento de su uso en estudios electrofisiológicos.

5.2. Análisis de las corrientes aniónicas por *patch-clamp*

Medida de las corrientes aniónicas por patch-clamp

Todos los experimentos electrofisiológicos se realizaron en los laboratorios del Departamento de Farmacología y Terapéutica, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Para ello, los conductos pancreáticos recién aislados se transportaron en medio de cultivo, en hielo, hasta Madrid, donde se pusieron en cultivo primario durante toda la noche, y donde, a la mañana siguiente, se procedió a obtener células ductulares aisladas, como se ha descrito previamente.

Las corrientes aniónicas estimuladas por forskolina o por carbacol se analizaron, en células ductulares aisladas de ratones CF y de sus correspondientes controles, utilizando la técnica de *patch-clamp*,¹²⁷ en su modalidad de fijación de voltaje y configuración de parche perforado.^{193,265}

La técnica de *patch-clamp* en su modalidad de fijación de voltaje consiste en mantener fija la diferencia de potencial de un parche de membrana plasmática con ayuda de un amplificador: si en respuesta a un determinado estímulo se produce alguna corriente de entrada o salida de iones a través de canales iónicos presentes en el parche de membrana, la corriente que es necesario inyectar para mantener fijo el potencial de membrana será equivalente al flujo de iones que se ha producido. Esta técnica emplea un único electrodo que simultanea, a elevada frecuencia, el control del voltaje (potencial de membrana de la célula) y el registro de la corriente eléctrica generada.

Para ejecutar la técnica se debe formar un sello de alta resistencia eléctrica entre la membrana celular y el electrodo de registro, para lo cual éste se introduce en el interior de una micropipeta de vidrio cuya punta se pule al fuego hasta poseer un diámetro de aproximadamente 1 μm (equivalente a una resistencia entre 3-5 M Ω). La micropipeta, montada

sobre el soporte de un micromanipulador (MHW-103, Narishige), se aproxima a la membrana de la célula y se presiona contra ella y mediante la aplicación de una ligera succión o presión negativa en su interior permite conseguir sellos de resistencia aún mayor, del orden de 10-100 $G\Omega$, conocidos como *giga-sellos*, que reducen el ruido del registro y evitan el flujo de corriente entre la pipeta y el baño. Se adquiere así la configuración de parche *in situ* (*cell attached*).

A partir de la configuración de parche *in situ* se puede pasar a la de célula completa aplicando una brusca succión al interior de la pipeta, lo que normalmente provoca la ruptura del parche de membrana y permite el registro de la actividad eléctrica de la totalidad de la membrana plasmática de la célula.¹²⁷ Esta configuración de célula completa tiene la ventaja adicional de que el investigador puede controlar con precisión la composición del medio intracelular, puesto que el original se dializa hacia el interior de la pipeta y es completamente reemplazado por el contenido de esta, cuyo volumen se considera infinito comparado con el de la célula. Sin embargo, este fenómeno de diálisis constituye una de las principales desventajas de esta configuración, pues imposibilita el estudio de procesos celulares que dependan de la presencia de componentes solubles en el citosol. Para el estudio de las corrientes en células ductulares pancreáticas de ratones controles y CF se utilizó una variación de la configuración de célula entera que es el llamado "parche perforado",^{193,265} que se obtiene por inclusión de un antifúngico (anfotericina B) en la solución del interior de la pipeta de *patch-clamp*; los antifúngicos forman poros en el parche de membrana que queda atrapado bajo la punta de la pipeta y permiten así el acceso eléctrico al interior celular.

Para conseguir esta configuración se parte de la configuración de parche *in situ* y se espera a que la anfotericina B forme los poros en la membrana, sin aplicar succión alguna. La anfotericina B forma canales, en las membranas celulares que contienen colesterol o ergosterol, que son permeables a iones monovalentes e impermeables a iones multivalentes como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} y a moléculas no electrolíticas de tamaño igual o superior al de la glucosa. De esta forma, el investigador controla la concentración de iones monovalentes del líquido intracelular (que se iguala con la de la pipeta), mientras se mantienen intactas las rutas de señalización intracelular implicadas en las respuestas fisiológicas de la célula.

En todos los experimentos, las células se colocaron en una pequeña cámara de metacrilato situada en la plataforma de un microscopio invertido Nikon Eclipse T2000. Una vez en la placa,

las células se perfundieron con una solución control, con un flujo basal de alrededor de 1 ml·min⁻¹. Los registros electrofisiológicos se realizaron a temperatura ambiente (22 ± 1°C) con las pipetas montadas sobre el preamplificador de un amplificador de *patch-clamp* EPC-10 (HEKA Elektronik), que permite la supresión de los transitorios capacitativos y la compensación electrónica de las resistencias en serie.

Para la estimulación celular, la adquisición de datos y su posterior análisis, se empleó el programa PULSE (HEKA Elektronik) y un ordenador PC. Los registros se adquirieron con una frecuencia de muestreo de 5-10 kHz y se filtraron a 1-2 kHz. Los registros con una corriente de fuga superior a 100 pA se descartaron. También se descartaron aquellas células en las que la resistencia de acceso del transitorio capacitativo no alcanzaba valores inferiores a 30 MΩ.

Las pipetas de registro empleadas se fabricaron a partir de capilares de vidrio de borosilicato, con ayuda de un estirador vertical de vidrio (PP-830, Narishige) en dos pasos, puliéndose posteriormente la punta con ayuda de una microforja (MF-830, Narishige) hasta alcanzar un diámetro de aproximadamente 1 μm y una resistencia de 3-5 MΩ una vez rellenas con la correspondiente solución intracelular.

Las soluciones extracelulares que superfunden a las células se intercambiaron mediante un sistema de válvulas excluyentes controladas electrónicamente, acopladas a una pipeta de perfusión cuya punta se posicionaba a menos de 100 μm de la célula en experimentación. La velocidad de este sistema de perfusión es consecuencia de la presión por gravedad ejercida sobre el líquido, siendo de aproximadamente 1 ml·min⁻¹, permitiendo el completo recambio de las soluciones experimentales alrededor de la célula en unos 50 ms.

Soluciones de perfusión

Para evitar la contribución de corrientes de K⁺ en los resultados, todos los experimentos se llevaron a cabo con soluciones nominalmente libres de este catión.

La composición de la solución de perfusión extracelular (solución del baño) fue la siguiente: NaCl 140 mM, D-Glc 5 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7.4. A esta solución se añadieron, en su caso, agonistas de la secreción ductular (forskolina 10 μM + IBMX 200 μM, o carbacol 30 μM) y, en algunos experimentos, se añadió el bloqueante H₂DIDS 500 μM. El

IBMX, un inhibidor competitivo y no selectivo de las fosfodiesterasas, se utilizó junto con la forskolina con el fin de inhibir la hidrólisis del cAMP producido y así potenciar sus efectos, algo conveniente en experimentos realizados a temperatura ambiente.¹¹⁴

La solución intracelular (solución de la pipeta) contenía aspartato sódico 120 mM, NaCl 20 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 5 mM, pH 7.3.

Con el fin de conseguir el parche perforado, a esta solución intracelular se le añadió anfotericina B a una concentración final de 0.5 mg·ml⁻¹. La anfotericina B se añadía a partir de una solución madre preparada en DMSO, a la concentración de 50 mg·ml⁻¹; la disolución completa de la anfotericina B se consiguió haciendo pasar la solución repetidas veces a través de una aguja de insulina. La concentración final de anfotericina se obtenía añadiendo 20 µl de esta solución madre a 2 ml de solución intracelular, usando una jeringa y de nuevo haciéndola pasar repetidas veces por una aguja de insulina. Esta solución se mantenía en frío y protegida de la luz, y se empleaba en el plazo máximo de 2 h para asegurar que no se perdiese la actividad del antifúngico.

La punta de la pipeta de registro se sumergía brevemente en solución intracelular sin anfotericina B y a continuación se rellenaba por detrás con solución intracelular con anfotericina B. De este modo se podía conseguir la configuración de célula adherida antes de que el antifúngico hubiese difundido hacia la punta de la pipeta (la anfotericina B interfiere con la formación del *giga-sello*). El proceso de perforación, hasta alcanzar una resistencia en serie menor de 30 MΩ, tardaba 10-15 min.

Protocolos experimentales

Desde el momento de formación del *giga-sello*, y durante todo el resto del experimento, las células se mantuvieron habitualmente a un potencial de membrana "en reposo" de -45 mV, cercano al valor de -45.92 mV predicho por la ecuación de Nernst para el potencial de equilibrio del Cl⁻, a 22°C, con [Cl⁻]_e = 146 mM y [Cl⁻]_i = 24 mM:

$$E_{Cl^-} = -58.56 \cdot \log \frac{[Cl^-]_e}{[Cl^-]_i} = -45.92$$

A partir de este potencial de membrana, las células se sometieron a once pulsos de voltaje, de 500 ms de duración cada uno, en sentido creciente desde -110 mV hasta 90 mV, con incrementos de 20 mV. Este protocolo experimental está esquematizado en la Figura 9.

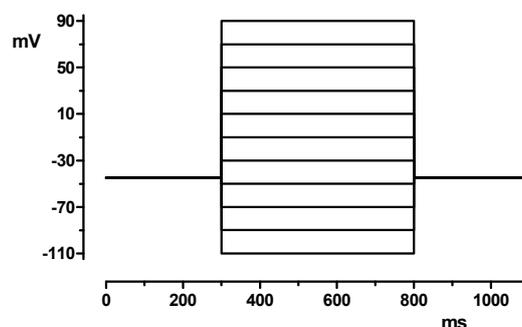


Figura 9: Esquema de los pulsos de voltaje aplicados a las células para registrar las corrientes aniónicas. A partir de un valor de potencial de membrana de -45 mV, se aplicaron pulsos de 500 ms de duración, en orden creciente desde -110 mV hasta 90 mV, a intervalos de 20 mV. Cada pulso de voltaje estuvo separado del siguiente por 600 ms durante los cuales se mantuvo el potencial de reposo de -45 mV.

Tras registrar las corrientes aniónicas presentes en situación basal, las células se estimularon con forskolina 10 μM + IBMX 200 μM , o con carbacol 30 μM , y se aplicó nuevamente el protocolo de pulsos de voltaje, registrándose las corrientes aniónicas activadas tras la estimulación. En algunas células se aplicó a continuación el inhibidor H₂DIDS 500 μM , con el fin de analizar la sensibilidad de las corrientes activadas a este bloqueante de transportadores aniónicos.

Las corrientes registradas utilizando este protocolo se representan superpuestas, para poder observar el "perfil de la corriente", que caracteriza a cada tipo de canal iónico. En todos los registros de corriente se seleccionó un periodo de tiempo, al final de cada pulso de voltaje (350 - 500 ms), se promedió la corriente registrada en ese tiempo para cada uno de los valores de voltaje aplicados a la célula, y a partir de estos datos se construyeron las correspondientes gráficas I/V, en las que se representa la corriente eléctrica registrada (pA) en respuesta a cada valor de potencial de membrana (mV).

6. ESTUDIOS EN ACINOS PANCREÁTICOS AISLADOS

6.1. Obtención de acinos pancreáticos

El método empleado para la obtención de acinos fue el de Peikin *et al.*,²⁵⁷ modificado por Jensen *et al.*¹⁶⁷

Se utilizó como medio tampón de incubación, con la siguiente composición: NaCl 98 mM, KCl 6 mM, KH₂PO₄ 2.17 mM, HEPES 24.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, CaCl₂ 0.5 mM, piruvato sódico 5 mM, fumarato sódico 6 mM, glutamato sódico 5 mM, D-Glc 11.5 mM, glutamina 2 mM, SBTI 0.1 mg·ml⁻¹, BME aminoácidos 1% (v/v), BME vitaminas esenciales 1% (v/v), BSA 10 mg·ml⁻¹, pH 7.45.

Para la digestión del páncreas se utilizó colagenasa CLSPA que se diluyó en tampón de lavado (tampón de incubación con BSA 0.1 mg·ml⁻¹ y CaCl₂ 2 mM) hasta una concentración final de 35.7 U·ml⁻¹.

En estos estudios se utilizaron ratones de la cepa Cftr^{tm1Cam}, tanto normales como CF. En cada experimento se sacrificaron dos animales por dislocación cervical, se abrió la cavidad abdominal y se extrajo el páncreas tirando del bazo. Seguidamente, se colocó cada glándula en una placa Petri con NaCl 150 mM frío, separándolas del bazo, tejido graso y ganglios linfáticos que las acompañan. A continuación, los páncreas se colocaron extendidos cada uno en una placa cubierta de cera y se sujetaron con agujas finas.

Se hinchó cada glándula inyectando en su intersticio 6 ml de la solución de colagenasa, usando una aguja fina doblada. El exceso de colagenasa se recogió y se reinyectó hasta hinchar por completo los páncreas. Seguidamente se les dio la vuelta y se inyectaron otros 2 ml de colagenasa.

A continuación se pusieron ambos páncreas en un Erlenmeyer, junto con la colagenasa que quedaba en las placas, se gaseó con 100% O₂ y se cerró con un tapón de goma. Los páncreas se incubaron en un baño a 37°C durante 10 minutos y con una agitación de 150–200 ciclos·min⁻¹. Pasados los 10 minutos se decantó el sobrenadante y se reemplazó por 5 ml de solución de

colagenasa nueva. Se oxigenó y se agitó durante 10 minutos en las mismas condiciones. Tras esta incubación, se decantó el sobrenadante y se reemplazó por otros 8 ml de colagenasa. Se repitió la oxigenación y la agitación en las mismas condiciones.

Terminadas las tres incubaciones, el páncreas se rompió mediante agitación vigorosa del Erlenmeyer. Se comprobó si la digestión había sido suficiente y, en caso contrario, se realizó una nueva agitación en el baño durante 2 minutos, al cabo de los cuales se volvió a agitar vigorosamente el Erlenmeyer.

Utilizando una pipeta Pasteur se transfirió la solución a tres tubos cónicos de 15 ml que contenían alrededor de 10 ml de tampón de parada (tampón de incubación con BSA 40 mg·ml⁻¹ y CaCl₂ 2 mM). Se burbujeó aire con la pipeta Pasteur desde el fondo de los tubos para limpiar las células. Se dejó reposar unos segundos, se recogió el material depositado en el fondo de los tubos y se pasó a un cuarto tubo con tampón de parada. Se burbujeó aire en este tubo, como en los otros, descartando el material que se depositó en el fondo.

A continuación los tubos se centrifugaron a 200 g durante 10 segundos, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células de cada tubo en 1 ml de tampón de lavado. Se repartieron las células de uno de los tubos entre los otros tres. Se rellenaron los tubos con tampón de lavado. Se burbujeó aire desde el fondo y, mirándolos al trasluz, se limpiaron los acinos con la pipeta Pasteur, eliminando los trozos grandes.

Los tubos se centrifugaron de nuevo a 200 g y se decantó el sobrenadante. Se resuspendieron las células de cada tubo en 1 ml de tampón de incubación. Se distribuyeron los acinos de un tubo en los otros dos y se rellenaron con tampón de incubación. Se limpiaron los acinos de la misma manera que en el paso anterior, volviéndolos a centrifugar a 200 g. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron los acinos en 1 ml de tampón de incubación, mezclándolos en un solo tubo; se volvió a llenar con tampón de incubación, se limpiaron y se centrifugaron. Los acinos se resuspendieron en 5 ml de tampón de incubación y se mantuvieron en el baño a 37°C con agitación suave hasta el momento de su utilización.

Los acinos pancreáticos aislados de ratón se han utilizado en dos tipos de estudios, que se detallarán a continuación:

1. Análisis de la secreción de amilasas.
2. Medida de la concentración de calcio citosólico libre ($[Ca^{2+}]_c$).

6.2. Análisis de la secreción de amilasas

Incubación de los acinos con secretagogos

Una vez extraídos los acinos pancreáticos de ratón, de la forma descrita anteriormente, se procedió a analizar la secreción de amilasas. El método utilizado fue el de Gardner y Jackson.¹⁰³ Usando este método se hicieron curvas dosis-respuesta a CCK-8 y carbacol, utilizando las siguientes concentraciones:

CCK-8: $10^{-8}M$, $3.2 \cdot 10^{-9}M$, $10^{-9}M$, $3.2 \cdot 10^{-10}M$, $10^{-10}M$, y $3.2 \cdot 10^{-11}M$

Carbacol: $10^{-5}M$, $3.2 \cdot 10^{-5}M$, $10^{-6}M$, $3.2 \cdot 10^{-6}M$, $10^{-7}M$, y $3.2 \cdot 10^{-7}M$

Los acinos obtenidos se diluyeron en 20 ml de tampón de incubación (cuya composición se describió en el apartado de obtención de acinos) en un Erlenmeyer grande, para facilitar la agitación de la muestra.

De esta solución de acinos se pipetearon 200 μ l en los tubos Eppendorf que servirán para determinar la cantidad de amilasa inicial en el medio. Estos tubos "cero" se centrifugaron inmediatamente durante 2 minutos a 600 g. A continuación se retiraron 25 μ l del sobrenadante y se añadieron al correspondiente tubo de determinación de amilasas.

Seguidamente se pipetearon 500 μ l de la suspensión acinar en los tubos de incubación, conteniendo cada uno de ellos 5 μ l del estímulo o bien 5 μ l de agua para la medida de la secreción basal. Estos tubos se oxigenaron, se taparon, se agitaron, y seguidamente, se colocaron en un baño de incubación durante 30 minutos a 37°C, con agitación suave (60 ciclos·minuto⁻¹). El mismo protocolo se repitió a intervalos de 10 minutos hasta completar 3 series idénticas, es decir, el efecto de cada concentración de los agonistas se analizó por triplicado.

Se prepararon dos tubos totales, pipeteando en ellos 5 ml de solución de lisis (NH_2PO_4 10 mM, SDS 1 mg·ml⁻¹, BSA 1 mg·ml⁻¹, $CaCl_2$ 1 mM, pH 7.8) y añadiéndoles 500 μ l de suspensión de

células. Estos tubos sirven para medir la cantidad de amilasa total presente en los acinos. Una vez preparados, se agitaron y mantuvieron a temperatura ambiente hasta el momento de la determinación de amilasas; entonces, se pipetearon 75 μl de cada uno de ellos al correspondiente tubo de determinación.

Una vez finalizada la incubación de cada serie, se pasaron 200 μl de cada tubo a un tubo Eppendorf para centrifugarlos 2 minutos a 600 g. A continuación, se pipetearon 25 μl del sobrenadante al correspondiente tubo de determinación de amilasas.

Una vez hecho esto con cada una de las tres series, se añadieron 50 μl de solución de lisis en todos los tubos de determinación de amilasas, excepto en los totales.

Determinación de amilasas

Para la medida de amilasas se utilizó la adaptación comercial (Phadebas® Amylase Test) del método de Ceska *et al.*⁴⁸

Se añadió una pastilla de Reactivo de Phadebas® por cada 8 ml de reactivo de amilasas (NaCl 50 mM, NH_2PO_4 20 mM, azida sódica 0.2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, pH 7.0). Esta suspensión se mantuvo en agitación constante, añadiéndose a cada tubo de determinación de amilasas 400 μl del reactivo. A continuación, los tubos se agitaron y se colocaron en un baño a 37°C durante 10 minutos. Una vez finalizada la incubación se paró la reacción añadiendo a cada tubo 200 μl de NaOH 0.5 N; a continuación, se diluyó con 2 ml de agua destilada. Una vez agitados, los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 g, y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 620 nm en un espectrofotómetro.

La cantidad de amilasas secretada se expresa como porcentaje con respecto al contenido total de esta enzima en los acinos, previa resta de la existente en el medio antes de comenzar la incubación.

Análisis estadístico

Se calculó la media y el error estándar de la media (S.E.M.) de los valores de secreción de amilasas en cada grupo de animales y situación experimental. Las diferencias entre los grupos

se analizaron mediante el test de la *t* de Student, y se consideraron significativas cuando *P* fue menor de 0.05.

6.3. Medida de la concentración de calcio citosólico libre

Fundamento de la técnica

Para la medida de la concentración de Ca^{2+} citosólico libre se empleó el método de Sato *et al.*,²⁹⁰ usando Fura-2 como indicador. La estructura de esta molécula le confiere propiedades de fluorescencia y le permite establecer 8 coordinaciones capaces de quelar Ca^{2+} . Este compuesto presenta dos formas moleculares: unida al Ca^{2+} y libre de Ca^{2+} . El indicador unido al Ca^{2+} tiene un máximo de excitación a 340 nm, mientras que la forma libre presenta el máximo de excitación a 380 nm. La fluorescencia emitida se registró a una λ de 505 nm, utilizándose la ratio o cociente de intensidades entre las dos λ elegidas, F_{340}/F_{380} .

Soluciones

Para la medida de Ca^{2+} se utilizó, salvo cuando se especifica lo contrario, tampón de calcio (tampón de incubación, cuya composición fue descrita en el apartado de obtención de acinos pancreáticos, pero sin piruvato, sin fumarato y sin BSA).

Carga de los acinos con Fura-2-AM

El fundamento de la carga de las células acinares con Fura-2 es similar al descrito para el BCECF en el apartado de medida del pH_i; en células ductulares: el Fura-2-AM es una molécula que atraviesa la membrana plasmática con facilidad, entrando en las células, donde esterasas endógenas del citosol actúan sobre la forma éster del indicador Fura-2-AM, apareciendo la forma libre Fura-2. Esta nueva molécula no atraviesa la membrana plasmática y queda atrapada dentro de las células.

Los acinos se resuspendieron, tras la última centrifugación (vista en el apartado de extracción de acinos), en 5.5 ml de tampón de calcio con BSA (tampón de incubación sin piruvato sódico, sin fumarato sódico y con BSA 2 mg·ml⁻¹). Por otro lado, se pusieron en un tubo Falcon grande

5 ml de tampón de calcio con BSA, añadiendo el Fura-2-AM (disuelto inicialmente en DMSO y almacenado a -70°C en alícuotas con una concentración de 1 mM) a una concentración final de $5\ \mu\text{M}$, junto con ácido Plurónico® F-127 (disuelto en DMSO 10% y almacenado en alícuotas de $100\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), a una concentración final de $0.25\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. El ácido Plurónico® F-127 es un detergente de baja toxicidad que se utiliza para facilitar la carga de las células con el Fura-2-AM. A esta solución se le añadieron 5 ml de la suspensión de acinos, y se recubrió el Falcon con papel de aluminio, ya que el Fura-2-AM es un compuesto sensible a la luz. A continuación, los acinos se oxigenaron con 100% O_2 y se incubaron en un baño con agitación constante durante 60 minutos a 37°C , oxigenándolos cada 20 minutos.

En este tiempo, $500\ \mu\text{l}$ de la suspensión de acinos, separados previamente a la carga con Fura-2-AM, se centrifugaron y se lavaron dos veces con tampón de calcio. Seguidamente, se resuspendieron en 2 ml del mismo tampón y se oxigenaron, manteniéndose a temperatura ambiente hasta el momento de medir la autofluorescencia.

Una vez finalizada la incubación, los acinos cargados con Fura-2-AM se lavaron dos veces con tampón de calcio. A continuación, se resuspendieron en dicho tampón (el volumen final depende del rendimiento de obtención de acinos), se oxigenaron y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la medida del Ca^{2+} citosólico libre.

Medida del calcio citosólico libre

Los niveles de Ca^{2+} se calcularon a partir de la fluorescencia registrada en los acinos cargados con Fura-2, utilizando un espectrofluorímetro Hitachi F-2500 FL.

Los experimentos se llevaron a cabo en alícuotas de 2 ml de la suspensión acinar, que se colocaron en una cubeta de cuarzo con agitación suave y constante, cuya temperatura se mantuvo a 37°C mediante un baño acoplado. La fluorescencia se midió, tras un tiempo de equilibrado, durante 10 minutos de la siguiente manera:

- Se registró la fluorescencia emitida por los acinos, en condiciones basales, durante 1 minuto.

- A los 60 segundos, se añadieron directamente a la cubeta 20 μl de estímulo, CCK-8 o carbacol, a las siguientes concentraciones finales:

CCK-8: 10^{-9}M o 10^{-10}M

Carbacol: 10^{-6}M o 10^{-5}M

- A los 7 minutos, se añadieron a la cubeta 50 μl de una solución de digitonina 5 mM. Este compuesto sirve para permeabilizar las células acinares y permite la entrada de Ca^{2+} en ellas. De esta forma, se registró el valor de fluorescencia en condiciones de saturación del Fura-2 con Ca^{2+} .
- A los 9 minutos, se añadieron 150 μl de EGTA 500 mM (preparado en tampón Tris-HCl 3 M, pH 8.9). El EGTA es un agente quelante que disocia el complejo Ca^{2+} -Fura y permite registrar la señal de fluorescencia cuando el Fura-2 está libre de Ca^{2+} .

Previamente, en cada preparación de acinos se determinó el valor de la autofluorescencia (durante 60 s) con los 2 ml de la suspensión de acinos que no se cargaron con Fura-2-AM.

Los valores de la concentración de Ca^{2+} se calcularon según el método de Grynkiewicz *et al.*¹²³

La ecuación que relaciona la ratio con la concentración de Ca^{2+} citosólico libre es la siguiente:

$$[\text{Ca}^{2+}] = Kd^{Fura2} \cdot \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \cdot \left(\frac{Sf_{380}}{Sb_{380}} \right)$$

R (ratio) es el cociente F_{340}/F_{380} en cada momento del experimento; R_{\max} y R_{\min} son los valores de la ratio en condiciones de saturación de Ca^{2+} (al añadir digitonina) y libre de Ca^{2+} (con EGTA), respectivamente.

Kd^{Fura2} es la constante de disociación del Fura-2 para el Ca^{2+} . En nuestras condiciones experimentales el valor para esta constante es de 224 nM.

Sf_{380}/Sb_{380} es la ratio entre la intensidad de fluorescencia, a 380 nm, cuando el indicador está libre (Sf) y la intensidad, a 380 nm, cuando el indicador está totalmente unido a Ca^{2+} (Sb). Los valores de intensidad de autofluorescencia a 340 nm y a 380 nm se restaron de los respectivos valores de fluorescencia obtenidos en cada experimento. Se calcularon los valores

de ratio, así como R_{max} , R_{min} , Sf_{380} , Sb_{380} y, mediante la fórmula indicada, y con la ayuda de una hoja de cálculo informática, se obtuvo la $[Ca^{2+}]_c$ a lo largo del experimento.

Para el análisis comparativo de los valores de $[Ca^{2+}]_c$ se eligieron siete periodos representativos en cada registro, cada uno de ellos de 10 segundos de duración; estos periodos fueron: basal (previo a la aplicación del estímulo), estímulo (inmediatamente después de añadir el estímulo) y minuto 1 a minuto 5 (en referencia al tiempo transcurrido desde la aplicación del estímulo). Para realizar este análisis, se calculó la media de los datos obtenidos en cada registro en cada uno de estos periodos (6 datos por periodo).

Análisis estadístico

Se calculó la media y el error estándar de la media (S.E.M.) de los valores de $[Ca^{2+}]_c$ en cada grupo de animales y situación experimental. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante el test de la t de Student y se consideraron significativas cuando P fue menor de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS INTRACELULARES IMPLICADOS EN LA ACTIVACIÓN DE LA SECRECIÓN EN CONDUCTOS PANCREÁTICOS DE RATONES NORMALES Y CF

1.1. Efectos de la inhibición de la proteína cinasa A (PKA) en la respuesta secretora de conductos pancreáticos de ratones normales y CF

1.1.1. Respuesta de los conductos pancreáticos de ratones normales y CF a la estimulación con forskolina

En una primera serie de experimentos, analizamos la respuesta secretora de los conductos pancreáticos de ratones de la cepa $Cftr^{tm1Cam}$, en situación basal y en respuesta a forskolina, mediante la técnica de videomicroscopía descrita en el apartado de *Materiales y Métodos*.

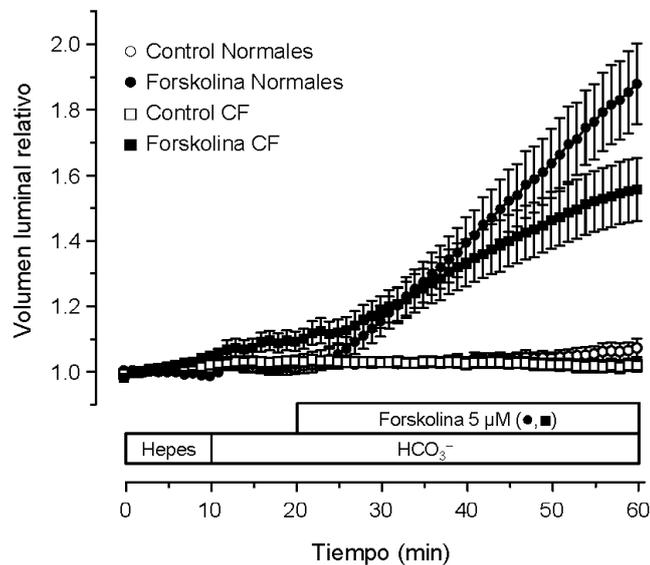


Figura 1. Secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales y CF. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- en ausencia (○, n=15; □, n=17) o en presencia de forskolina $5 \mu M$ (●, n=17; ■, n=31). Los conductos procedían de ratones normales (○, ●) o de ratones CF (□, ■). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

En los experimentos de secreción basal (controles), los conductos pancreáticos aislados de ratones normales y CF se perfundieron con tampón HEPES (carente de HCO_3^-) durante 10 minutos, y a continuación con tampón HCO_3^- , durante 50 minutos. En estas condiciones, los conductos no muestran ningún cambio aparente en su volumen luminal relativo a lo largo del tiempo (Figura 1) y sus tasas secretoras se mantienen en valores cercanos a cero en todos los periodos analizados (Figura 2). Estos resultados confirman lo descrito previamente por nuestro grupo, en el sentido de que, en los conductos pancreáticos de ratón, no hay una secreción basal significativa, ni en ausencia ni en presencia de HCO_3^- ,^{91,256} en contraste con lo observado en conductos de otras especies, como el cobaya, en los que, en presencia de HCO_3^- , sí que hay una secreción significativa de fluido en ausencia de estímulo, del orden de $70 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$.⁹¹

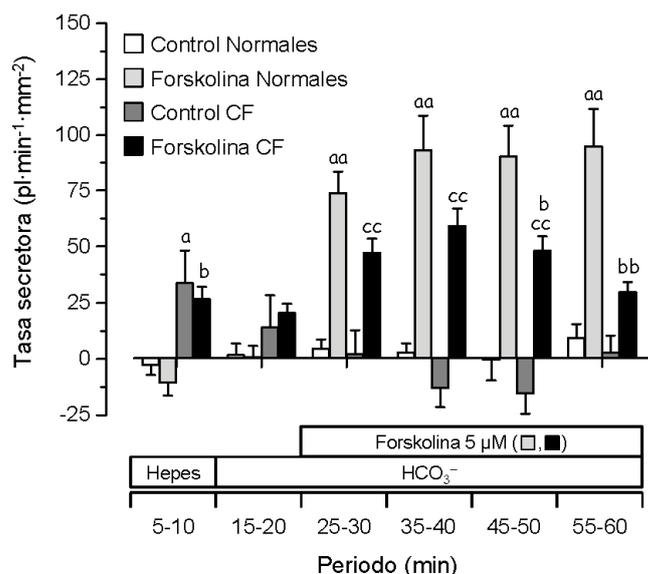


Figura 2. Secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales y CF. Tasa secretora en conductos pancreáticos perfundidos con solución HCO_3^- , en ausencia (\square , n=15; \blacksquare , n=17) o en presencia de forskolina $5 \mu\text{M}$ (\square , n=17; \blacksquare , n=31). Los conductos procedían de ratones normales (\square , \blacksquare) o de ratones CF (\square , \blacksquare). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 1 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del ANOVA fueron significativos en los periodos 5-10, 25-30, 35-40, 45-50 y 55-60 ($P < 0.01$). Los resultados del test de Scheffé se muestran como "a" $P < 0.05$ y "aa" $P < 0.01$ con respecto a la situación control en conductos de ratones normales; "b" $P < 0.05$ y "bb" $P < 0.01$ con respecto a los conductos de ratones normales estimulados con forskolina, y "cc" $P < 0.01$ con respecto a la situación control en conductos de ratones CF.

Con independencia de lo expuesto anteriormente, es relativamente frecuente que en los experimentos de análisis de la secreción de fluido por videomicroscopía, obtengamos tasas de secreción (o de reabsorción) estadísticamente significativas en los periodos iniciales del experimento, cuando los conductos se perfunden con solución HEPES o con solución HCO_3^- , sin ningún tipo de sustancia añadida. Esta secreción (o reabsorción) basal significativa podría producirse por fenómenos de adaptación de los conductos pancreáticos a un medio con características fisicoquímicas, como temperatura o composición iónica de la solución de perfusión, diferentes a las condiciones previas. Si bien los cambios que se observan en los primeros minutos del experimento se podrían reducir, o incluso evitar, aumentando el periodo de tiempo de equilibrado de los conductos en la solución HEPES, aquellos que se producen al cambiar a la solución HCO_3^- son mucho más incontrolables. En todo caso, los valores de secreción obtenidos en los primeros minutos de los experimentos no se han considerado a la hora de obtener conclusiones de los diferentes protocolos experimentales.

La forskolina es un diterpeno, aislado inicialmente de la planta *Coleus forskohlii*, que actúa como un activador de la adenilil ciclasa.³⁰¹ Este agente es un potente estimulante de la secreción de agua y electrolitos en los conductos pancreáticos aislados,⁹¹ y su efecto es mucho más marcado y reproducible que el del principal agonista fisiológico que utiliza la ruta del cAMP, la secretina. Esto se ha interpretado como una consecuencia de fenómenos de desensibilización de los receptores de secretina durante el periodo de cultivo.⁹¹

Hemos analizado la respuesta secretora de los conductos de ratones normales tras la adición de forskolina 5 μM al medio de perfusión. Los resultados muestran que esta sustancia produce, tras un cierto retraso (debido sobre todo al volumen muerto del sistema de perfusión), un incremento constante del volumen luminal relativo de los conductos (Figura 1): los valores medios alcanzados, tras 40 minutos de estimulación con forskolina, superan en algo más del 80% a los obtenidos al inicio del experimento. En cuanto a las tasas secretoras, observamos que en los conductos de ratones normales se alcanzan valores estables, cercanos a $100 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$, en los últimos 30 minutos del experimento (Figura 2). Estos valores son, en todos los periodos analizados, significativamente más altos que los obtenidos en situación basal, confirmándose así la eficacia de la elevación de los niveles de cAMP, por efecto de la

forskolina, como estimulante de la secreción de agua y electrolitos en las células ductulares pancreáticas.

Utilizando el mismo protocolo experimental, hemos analizado la respuesta secretora a la forskolina en conductos aislados de ratones CF, carentes del canal CFTR. Nuestros resultados muestran que, en un medio con concentraciones fisiológicas de Cl^- y de HCO_3^- (tampón HCO_3^-), la forskolina induce un incremento en el volumen luminal relativo (Figura 1) y en la tasa secretora (Figura 2) de los conductos de ratones CF; sin embargo, los valores de tasas secretoras alcanzados tras la estimulación con forskolina en estos conductos son significativamente menores que los obtenidos en los de ratones normales.

Los resultados de estos experimentos, necesarios para establecer las oportunas comparaciones en apartados posteriores de este trabajo, confirman lo descrito previamente por nuestro grupo, en el sentido de que los conductos pancreáticos de ratones CF mantienen una capacidad secretora reducida, pero significativa, en respuesta al incremento de los niveles de cAMP.²⁵⁶ Este hecho no podría explicarse mediante el modelo clásico de secreción en los conductos pancreáticos, ya que, según este modelo, el canal CFTR, ausente en los conductos de estos animales, sería necesario para mantener la secreción ductular.^{110,241} De acuerdo con nuestros resultados previos,²⁵⁶ el mantenimiento de la secreción en conductos de ratones carentes de CFTR se debe tanto al transporte de HCO_3^- como de Cl^- . Aunque se postuló que en estos animales CF los canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} (CACC) podrían hacerse cargo de la función del CFTR,³⁸⁷ nuestro grupo comprobó que la carga de las células ductulares con BAPTA, un quelante del Ca^{2+} , que anula por completo la respuesta secretora al carbacol, no modifica significativamente la respuesta a forskolina; estos resultados demuestran que la secreción mediada por cAMP que se mantiene en los conductos de los ratones CF no depende de los CACC.²⁵⁶

Así pues, en las células ductulares de los ratones CF debe existir algún mecanismo de transporte epitelial, distinto de CACC, capaz de mantener la secreción de aniones hacia el lumen de los conductos en ausencia de CFTR. Además, parece asumido que, en las células ductulares pancreáticas, el aumento en la concentración de cAMP activa los mecanismos secretores tras la fosforilación por la PKA del canal CFTR; sin embargo, nuestros resultados

indican claramente que en estas células debe existir alguna diana, distinta al CFTR, que responda al incremento en el cAMP.

1.1.2. Efecto de la inhibición de la actividad de la PKA sobre la secreción estimulada con forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales y CF

Con el fin de comprobar en qué medida la activación de la PKA es responsable del efecto de la forskolina sobre la secreción ductular, llevamos a cabo una serie de experimentos utilizando H-89, un potente inhibidor de esta enzima, a la concentración final de 10 μM . Se ha comprobado que esta concentración del bloqueante, que se puede encontrar habitualmente en la bibliografía, provoca una inhibición total de la actividad de la PKA.³³⁴ Además, se ha descrito que la IC_{50} para el H-89 es de 48 nM en la línea celular PC12D.⁶⁰

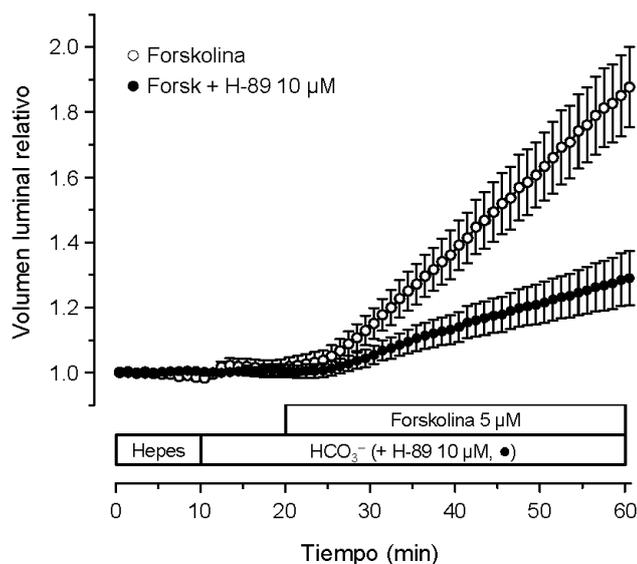


Figura 3. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- y estimulados con forskolina 5 μM en ausencia (\circ , $n=17$) o en presencia de H-89 10 μM (\bullet , $n=14$). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

La adición de H-89 10 μM al medio de perfusión (tampón HCO_3^-) provoca una marcada inhibición en la respuesta secretora de los conductos de ratones normales (Figura 3) y CF (Figura 5). El análisis de los cambios en el volumen luminal relativo muestra que el H-89 produce una reducción de la pendiente del incremento observado tras la estimulación con

forskolina en ambos grupos de animales (Figuras 3 y 5). En cualquier caso, el H-89 no bloquea por completo la respuesta secretora de los conductos, ya que, incluso en los minutos finales del experimento, los valores de volumen luminal relativo siguen incrementándose en presencia del inhibidor (Figuras 3 y 5).

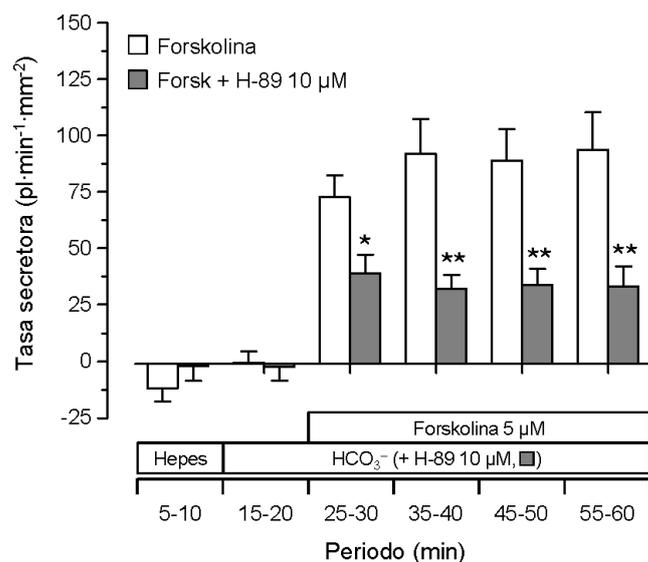


Figura 4. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales. Tasa secretora en conductos pancreáticos perfundidos con solución HCO_3^- y estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ en ausencia (\square , $n=17$) o en presencia de H-89 $10 \mu\text{M}$ (\blacksquare , $n=14$). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 3 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ con respecto a los conductos perfundidos en ausencia de H-89.

Lo anteriormente expuesto se confirma al analizar las tasas secretoras (Figuras 4 y 6). En el caso de los conductos de ratones normales (Figura 4), la exposición a H-89 provoca una disminución significativa en los valores de tasa secretora en respuesta a forskolina. En estos conductos, la secreción de fluido estimulada por forskolina es, en presencia de H-89, inferior al 50% de la obtenida en su ausencia. En el caso de los conductos de ratones CF (Figura 6) observamos que los valores de tasa secretora en presencia de H-89 son siempre inferiores a los obtenidos en su ausencia, aunque las diferencias entre ambas situaciones experimentales no alcanzan significación estadística.

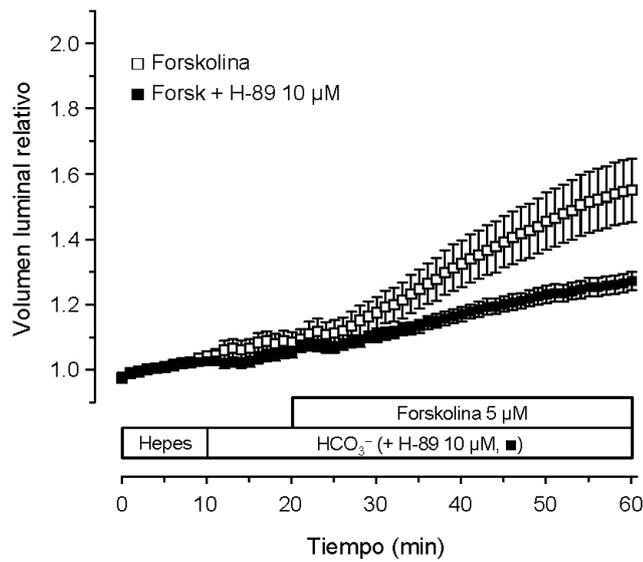


Figura 5. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones CF. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO₃⁻ y estimulados con forskolina 5 μM en ausencia (□, n=31) o en presencia de H-89 10 μM (■, n=21). Los valores se expresan cada minuto como media ± S.E.M.

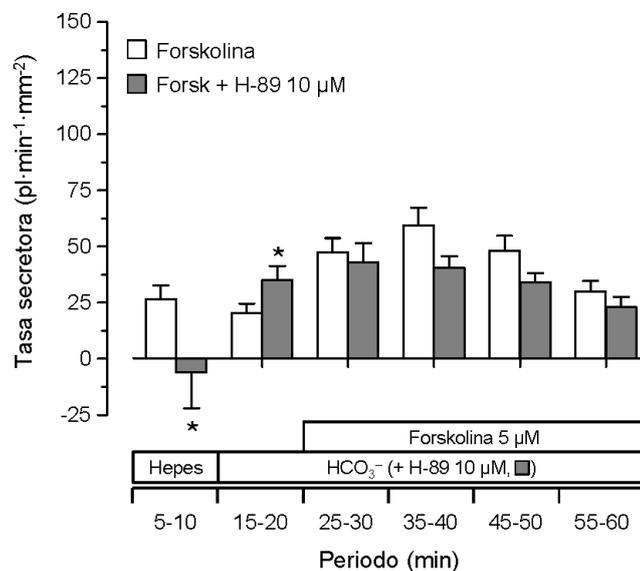


Figura 6. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones CF. Tasa secretora en conductos pancreáticos perfundidos con solución HCO₃⁻ y estimulados con forskolina 5 μM en ausencia (□, n=31) o en presencia de H-89 10 μM (■, n=21). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 5 y se expresan como media ± S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como * P < 0.05 con respecto a los conductos perfundidos en ausencia de H-89.

Tanto en conductos de ratones normales como de CF, la estimulación con forskolina, en presencia de H-89 10 μM , induce tasas secretoras de fluido que son significativamente mayores que cero en los últimos periodos del experimento (Figuras 4 y 6); es decir, el bloqueo de la PKA por el H-89 no es suficiente para anular la secreción de agua y electrolitos estimulada por forskolina en los conductos pancreáticos, ni de ratones normales ni de CF. Esto sugiere que, en ambos tipos de animales, existen mecanismos moleculares de transporte de aniones a través del epitelio ductular cuya activación por el cAMP no depende de la fosforilación por la PKA. Con el fin de avanzar en la caracterización de estos mecanismos, a continuación analizamos por separado la secreción de fluido dependiente de HCO_3^- y la mediada por el transporte de Cl^- .

1.1.3. Efecto de la inhibición de la actividad de la PKA sobre la secreción dependiente de HCO_3^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales y CF

La adición al medio de perfusión de bumetanida 30 μM , un potente bloqueante del cotransportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCC1), es capaz de anular por completo la secreción de fluido en conductos pancreáticos aislados de rata y de ratón perfundidos con un medio libre de HCO_3^- ,⁹¹ lo que demuestra que este cotransportador es el responsable de la acumulación de Cl^- a través de la membrana basolateral y, por lo tanto, de generar un gradiente favorable para su posterior secreción hacia el lumen ductular. La perfusión de los conductos con tampón HCO_3^- , que contiene tanto Cl^- como HCO_3^- , en presencia de bumetanida, eliminará la secreción de Cl^- mediada por este mecanismo de transporte.

En estas condiciones, la actividad conjunta del cotransportador $\text{Na}^+-2\text{HCO}_3^-$ (pNBC1) y del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE) basolaterales podría mantener una cierta secreción de Cl^- ; en todo caso, podemos afirmar que la secreción de fluido de los conductos perfundidos en estas condiciones es totalmente dependiente de la presencia de HCO_3^- en el medio de perfusión y, en consecuencia, nos referiremos a ella como "secreción dependiente de HCO_3^- ".

La adición de forskolina 5 μM al tampón HCO_3^- , en presencia de bumetanida 30 μM , provoca, en conductos pancreáticos de ratones normales, un incremento sostenido en su volumen luminal relativo a lo largo del tiempo (Figura 7). Este efecto se observa tanto en ausencia de H-89

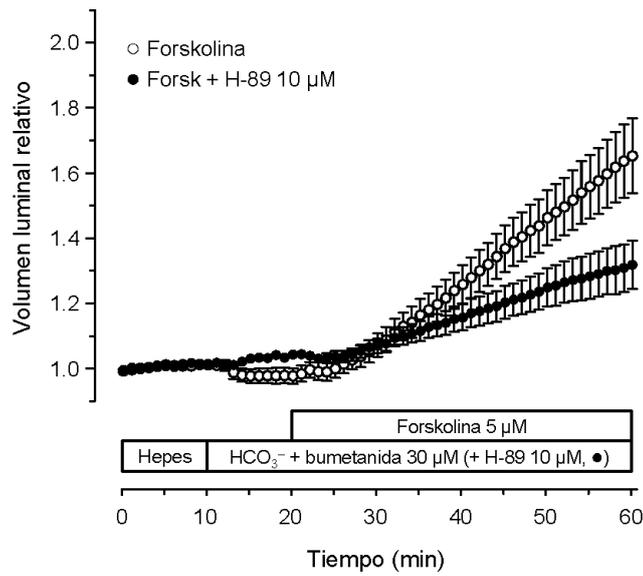


Figura 7. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción dependiente de HCO₃⁻ estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO₃⁻ conteniendo bumetanida 30 μM, estimulados con forskolina 5 μM en ausencia (○, n=14) o en presencia de H-89 10 μM (●, n=14). Los valores se expresan cada minuto como media ± S.E.M.

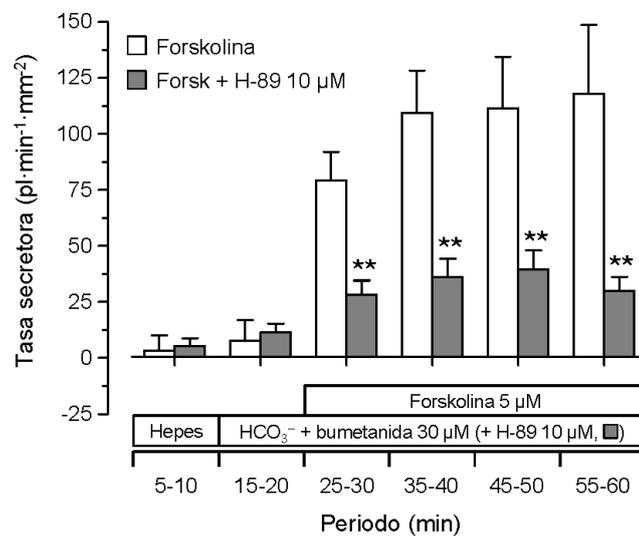


Figura 8. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción dependiente de HCO₃⁻ estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales. Tasa secretora en conductos perfundidos con solución HCO₃⁻ conteniendo bumetanida 30 μM, estimulados con forskolina 5 μM en ausencia (□, n=14) o en presencia de H-89 10 μM (■, n=14). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 7 y se expresan como media ± S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como ** P < 0.01 con respecto a los conductos perfundidos en ausencia de H-89.

como en su presencia, aunque en este último caso con una pendiente menor (Figura 7), lo que nos indica que la activación de la PKA no es un acontecimiento imprescindible para que el cAMP estimule la secreción de fluido dependiente de HCO_3^- en las células ductulares. El análisis de las tasas secretoras en estas condiciones experimentales (Figura 8) pone de manifiesto que el bloqueo de la actividad de la PKA con H-89 provoca una fuerte inhibición de la secreción dependiente de HCO_3^- , que pasa de valores cercanos a $110 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$ a valores de alrededor de $40 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$. Esta inhibición es estadísticamente significativa en todos los periodos en los que estuvo presente la forskolina en el medio de perfusión; sin embargo, las tasas secretoras en presencia de H-89 son, en todo momento, significativamente mayores que cero, según el test de la *t* de Student con respecto a la media poblacional.

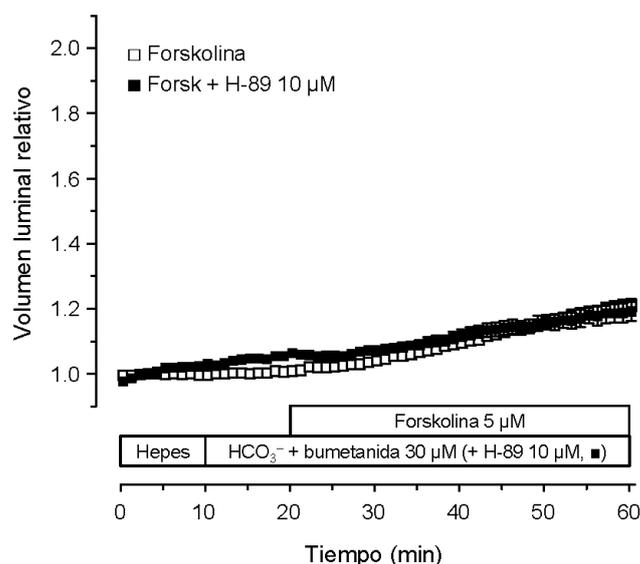


Figura 9. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción dependiente de HCO_3^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones CF. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- conteniendo bumetanida $30 \mu\text{M}$, estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ en ausencia (\square , $n=22$) o en presencia de H-89 $10 \mu\text{M}$ (\blacksquare , $n=21$). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

En conductos de ratones CF el volumen luminal relativo aumenta de forma moderada durante la estimulación con forskolina, tanto en presencia solo de bumetanida como de la combinación de bumetanida y H-89 (Figura 9). Al analizar las tasas secretoras se observa, al igual que en ratones normales, que el bloqueante de la PKA provoca una inhibición significativa de la secreción dependiente de HCO_3^- (Figura 10), que pasa de valores cercanos a $45 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$ a

valores de alrededor de $20 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$, que son significativamente mayores que cero en todos los periodos analizados (Figura 10).

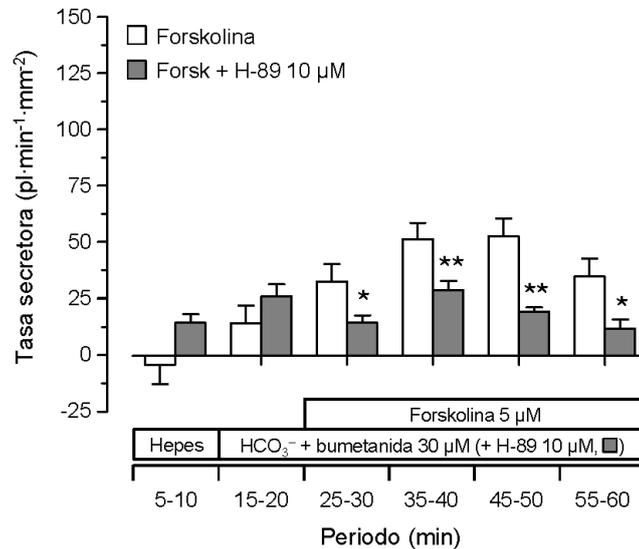


Figura 10. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción dependiente de HCO_3^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones CF. Tasa secretora en conductos perfundidos con solución HCO_3^- conteniendo bumetanida $30 \mu\text{M}$, estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ en ausencia (\square , $n=22$) o en presencia de H-89 $10 \mu\text{M}$ (\blacksquare , $n=21$). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 9 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ con respecto a los conductos perfundidos en ausencia de H-89.

Estos resultados indican que, tanto en ratones normales como CF, la activación de la PKA está implicada en la secreción dependiente de HCO_3^- tras la estimulación de los conductos con forskolina; sin embargo, la inhibición de esta enzima con H-89 no bloquea por completo la respuesta secretora (Figuras 8 y 10).

1.1.4. Secreción de HCO_3^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones CF

Como se ha explicado anteriormente, en un medio de perfusión que contiene tanto Cl^- como HCO_3^- , y en presencia de bumetanida para mantener bloqueado el NKCC1, la secreción ductular depende de HCO_3^- , puesto que el cotransportador $\text{Na}^+-2\text{HCO}_3^-$, el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y el intercambiador Na^+/H^+ basolaterales mantienen su actividad. En estas condiciones, la secreción neta de fluido puede ser consecuencia del transporte de Cl^- , de HCO_3^- o de ambos

aniones en distinta proporción. En realidad, hasta el momento no hemos comprobado si en conductos de ratones CF puede haber secreción de HCO_3^- , descartando así la hipótesis de que en estos animales se mantengan operativos mecanismos luminales capaces de transportar Cl^- pero no HCO_3^- . Esto tendría como consecuencia que toda la "secreción dependiente de HCO_3^- " observada en los conductos de ratones CF fuese en realidad secreción de Cl^- .

Evaluar la secreción de HCO_3^- en estos conductos requeriría disponer de un bloqueante específico para el intercambiador aniónico (AE) basolateral, en cuya presencia se mantendría la actividad de los dos mecanismos responsables de la acumulación de HCO_3^- en las células ductulares, el pNBC1 y el NHE1. Lamentablemente no disponemos de tal inhibidor específico, por lo que hemos utilizado H_2DIDS , compuesto que bloquea tanto al pNBC1 como al AE, manteniendo únicamente la actividad del NHE1. De esta forma, aunque no podamos cuantificar la secreción de HCO_3^- , sí podemos estar seguros de que cualquier secreción de fluido que observemos, tras la estimulación con forskolina, en presencia de bumetanida y H_2DIDS , dependerá exclusivamente del transporte de HCO_3^- .

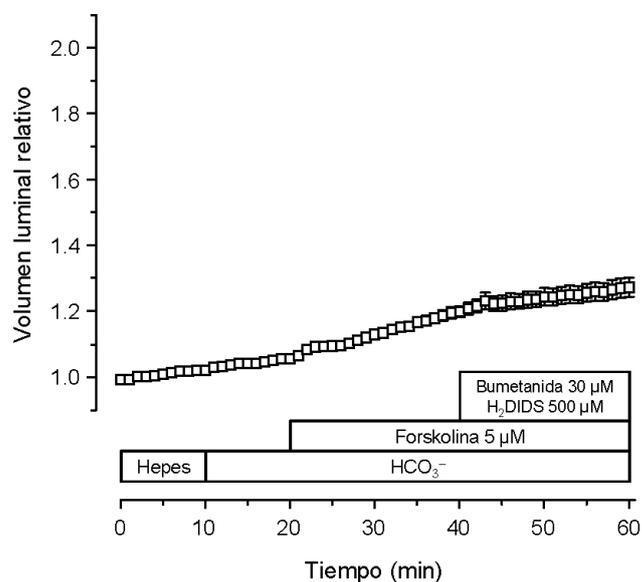


Figura 11. Secreción de HCO_3^- en conductos pancreáticos de ratones CF. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ en solución HCO_3^- , y en solución HCO_3^- conteniendo bumetanida $30 \mu\text{M}$ y H_2DIDS $500 \mu\text{M}$. Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M. (n=36).

Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran que la adición de bumetanida 30 μM y H_2DIDS 500 μM al medio de perfusión, cuando la secreción ya se encuentra estimulada por forskolina, produce una reducción de la pendiente del incremento del volumen luminal relativo (Figura 11); así, se observa que la pendiente del incremento entre los minutos 40-60 disminuye con respecto a los 20 minutos anteriores, en los que la secreción estaba estimulada con forskolina en ausencia de los inhibidores.

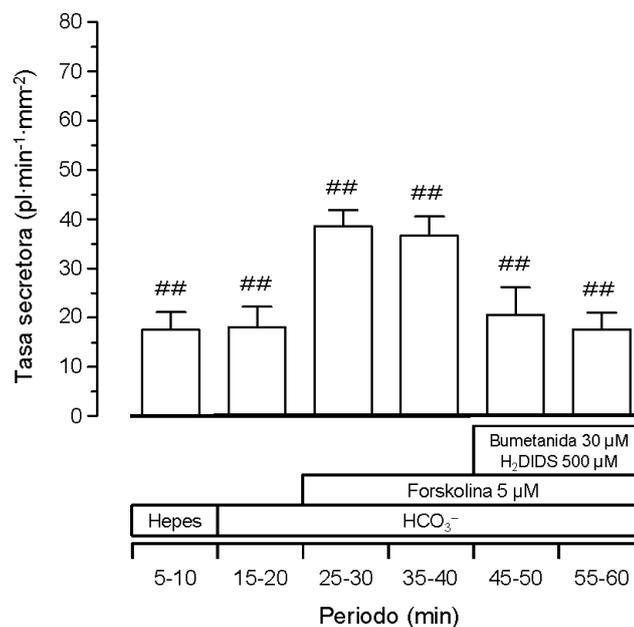


Figura 12. Secreción de HCO_3^- en conductos pancreáticos de ratones CF. Tasa secretora en conductos estimulados con forskolina 5 μM en solución HCO_3^- , y en solución HCO_3^- conteniendo bumetanida 30 μM y H_2DIDS 500 μM . Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 11 y se expresan como media \pm S.E.M. (n=36). Los resultados del test de la t de Student se muestran como ### $P < 0.01$ con respecto a cero.

El análisis de las tasas secretoras confirma estos resultados (Figura 12): la forskolina estimula la secreción de fluido en los conductos CF, hasta valores de alrededor de 40 $\text{pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$, pero esta respuesta se inhibe tras la adición de los bloqueantes, hasta valores de alrededor de 20 $\text{pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$. A pesar de esta inhibición, la secreción en conductos pancreáticos de ratones CF en respuesta a forskolina sigue manteniéndose estimulada, ya que las tasas secretoras fueron significativamente mayores que cero en todos los periodos analizados (Figura 12). En esta serie de experimentos obtuvimos una secreción basal significativa, tanto en ausencia como en presencia de HCO_3^- ; como ya hemos mencionado, este

hecho no nos parece relevante a la hora de interpretar estos resultados, puesto que, independientemente de cuáles sean los mecanismos responsables de esta secreción basal, es obvio que en los últimos periodos experimentales permanecen operativos mecanismos capaces de mediar una secreción neta de fluido hacia el lumen, que no se inhiben por la acción conjunta de la bumetanida y el H₂DIDS.

Estos resultados permiten descartar la hipótesis de que los conductos pancreáticos de animales CF sean capaces únicamente de transportar Cl⁻, y no HCO₃⁻, a través de la membrana luminal. Podemos concluir, por tanto, que los conductos pancreáticos de ratones carentes de CFTR mantienen operativos mecanismos secretores capaces de transportar HCO₃⁻ hasta el lumen ductular.

1.1.5. Efecto de la inhibición de la actividad de la PKA sobre la secreción de Cl⁻ estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales y CF

Nuestro grupo ha demostrado previamente que la secreción de agua y electrolitos en los conductos pancreáticos de ratas y ratones, perfundidos con un medio nominalmente libre de HCO₃⁻ (tampón HEPES), está mediada exclusivamente por procesos de transporte epitelial de Cl⁻ hacia el lumen de los conductos.⁹¹ En este apartado del trabajo hemos analizado de forma aislada la secreción de Cl⁻ y su dependencia de la activación de la PKA, en conductos pancreáticos de ratones normales y CF.

Nuestros resultados muestran que, en conductos pancreáticos aislados de ratones normales, perfundidos con tampón HEPES, la forskolina induce un claro incremento del volumen luminal relativo a lo largo del tiempo (Figura 13). Este efecto se observa tanto en ausencia de H-89 como en su presencia, si bien en este último caso con una menor pendiente, lo que indica que el bloqueo de la actividad de la PKA no es capaz de anular la secreción de Cl⁻ en las células ductulares pancreáticas de ratones normales. En el análisis de las tasas secretoras (Figura 14) observamos que la forskolina estimula la secreción de Cl⁻ y que la presencia de H-89 en el medio de perfusión no la inhibe de forma significativa, si bien los valores de tasa secretora en estas condiciones son siempre inferiores a los obtenidos en ausencia del bloqueante. Esta inhibición poco marcada contrasta con la observada en los experimentos en los que los conductos secretaban tanto Cl⁻ como HCO₃⁻ (Figura 4).

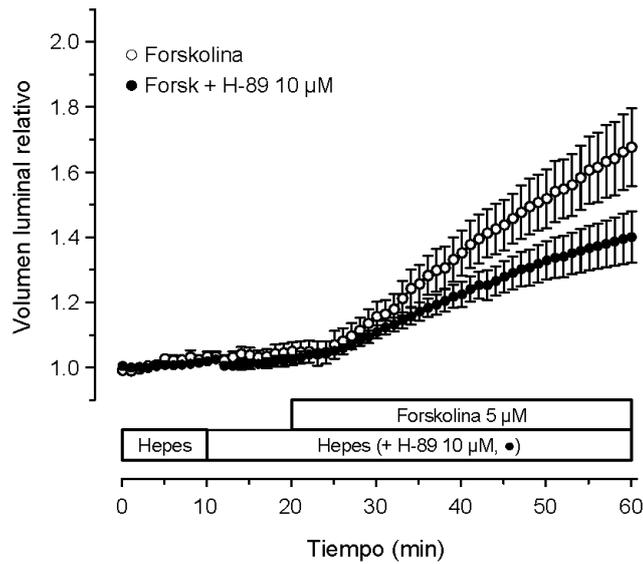


Figura 13. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción de Cl^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HEPES y estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ en ausencia (\circ , $n=31$) o en presencia de H-89 $10 \mu\text{M}$ (\bullet , $n=9$). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

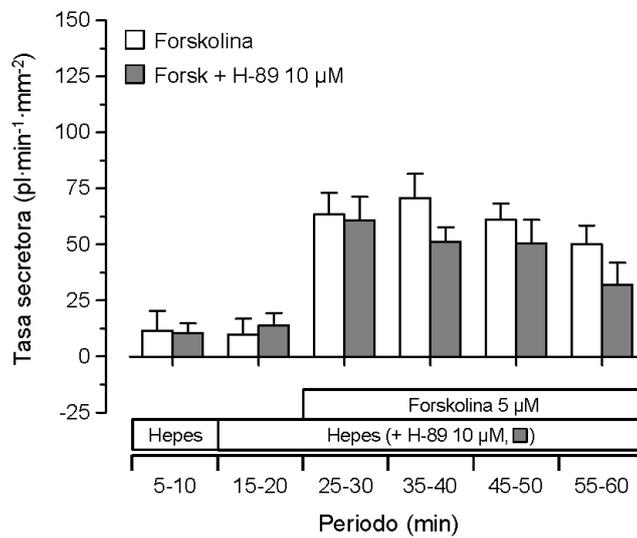


Figura 14. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción de Cl^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales. Tasa secretora en conductos perfundidos con solución HEPES y estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ en ausencia (\square , $n=31$) o en presencia de H-89 $10 \mu\text{M}$ (\blacksquare , $n=9$). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 13 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas.

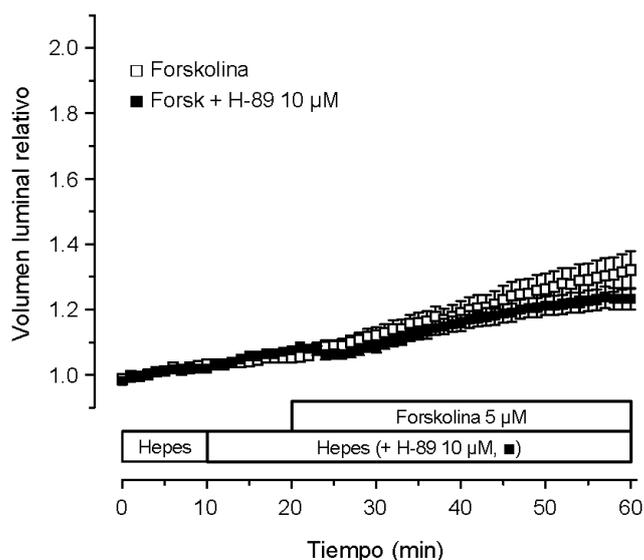


Figura 15. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción de Cl^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones CF. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HEPES y estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ en ausencia (\square , $n=16$) o en presencia de H-89 $10 \mu\text{M}$ (\blacksquare , $n=31$). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

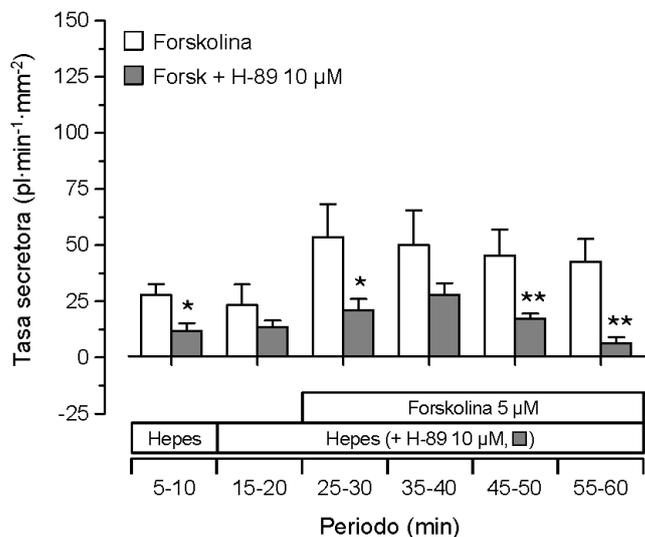


Figura 16. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción de Cl^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones CF. Tasa secretora en conductos perfundidos con solución HEPES y estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ en ausencia (\square , $n=16$) o en presencia de H-89 $10 \mu\text{M}$ (\blacksquare , $n=31$). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 15 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ con respecto a los conductos perfundidos en ausencia de H-89.

Utilizando el mismo protocolo experimental, observamos que la forskolina produce un incremento del volumen luminal relativo en conductos pancreáticos aislados de ratones CF (Figura 15). Este incremento, consecuencia del transporte transepitelial de Cl^- , que se produce tanto en presencia como en ausencia de H-89, es más moderado que en ratones normales (Figura 13). Al analizar las tasas secretoras en estos experimentos (Figura 16), comprobamos que la presencia de H-89 en el medio de perfusión reduce de forma significativa la secreción de Cl^- estimulada por forskolina en los conductos de ratones CF. A pesar de esta inhibición, el H-89 no bloquea por completo la respuesta secretora a forskolina, ya que, en todos los periodos analizados, encontramos valores de tasas secretoras significativamente mayores que cero en presencia del inhibidor.

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos en conductos pancreáticos aislados de ratones normales y CF, sometidos a las acciones del H-89 a la concentración de $10 \mu\text{M}$, nos indican que en ambos grupos de animales las células ductulares poseen mecanismos capaces de activar la secreción tras su fosforilación por la PKA y, al mismo tiempo, que en ambos grupos existen mecanismos cuya estimulación por el cAMP no depende de la activación de esta enzima. La primera afirmación se deduce del hecho de que la secreción de fluido estimulada por forskolina se inhibe de forma significativa por efecto del H-89, mientras que la segunda procede de la observación de que la inhibición ejercida por este bloqueante de la PKA es únicamente parcial, manteniéndose en todos los casos una secreción significativamente mayor que cero en respuesta a la forskolina.

La naturaleza de estos mecanismos es desconocida hasta el momento. Obviamente, parte de la respuesta dependiente de PKA en conductos pancreáticos de ratones normales es atribuible a la fosforilación y consiguiente activación del CFTR;¹¹⁴ sin embargo, el hecho de que en animales CF el H-89 también inhiba de forma significativa tanto la secreción dependiente de HCO_3^- como la secreción de Cl^- , pone de manifiesto que el CFTR, ausente en estos animales, no es el único mecanismo efector de la activación de la PKA. Si bien en muchos de los modelos de ratón modificados genéticamente para eliminar la proteína CFTR se ha observado que puede haber una expresión residual de CFTR funcional,¹²⁴ nuestro modelo, el $\text{Cftr}^{\text{tm1Cam}}$, se caracteriza precisamente por la total ausencia de esta proteína.²⁶⁹ En consecuencia, tenemos que pensar

en la existencia de un mecanismo de regulación alternativo en las células ductulares de estos animales, también activado por la PKA.

Existe muy poca información acerca de la eventual regulación por la PKA de los transportadores de membrana implicados en procesos secretores. Se ha descrito, por ejemplo, la activación del NKCC1 por efecto de la PKA en células epiteliales de la córnea del conejo³⁸⁰ y en glándulas submandibulares del ratón.⁴⁹ Aunque un incremento en la actividad de este cotransportador por acción de la PKA podría explicar nuestros resultados en la secreción de Cl^- , la inhibición que se observa en la secreción dependiente de HCO_3^- al bloquear la PKA, en conductos de ratones CF, no se puede atribuir a la falta de activación del NKCC1.

Por otra parte, aunque la presencia en la porción intracelular de la proteína pNBC1 de secuencias sustrato para la PKA se conoce desde hace años,^{2,164} su regulación positiva tras su fosforilación por PKA se ha descrito más recientemente, en criptas colónicas de ratón.²⁰ La información existente acerca de la eventual regulación del NHE1 por la PKA es mucho más confusa. Así, parece haber consenso en que el NHE1 no está sujeto a ningún tipo de regulación por agonistas que actúan por la ruta del cAMP,²⁸ aunque en la bibliografía también se pueden encontrar escasos trabajos que describen un efecto positivo de la PKA sobre este intercambiador, que cursa por un mecanismo muy indirecto, a través de la inhibición de la proteína G monomérica RhoA.^{40,170} No obstante, de manera similar a lo anteriormente expuesto para el NKCC1, una activación por la PKA del pNBC1 y/o del NHE1 en las células ductulares pancreáticas podría explicar, en este caso, la inhibición ejercida por el H-89 en la secreción dependiente de HCO_3^- en conductos de ratones CF, pero no la observada en la secreción de Cl^- .

Una alternativa que podría explicar nuestros resultados, tanto en lo referente a la secreción de Cl^- como a la secreción dependiente de HCO_3^- , sería una regulación positiva por la PKA del intercambiador aniónico luminal SLC26A6. No existe en la bibliografía ningún trabajo en el que se describa una acción directa de la PKA sobre la actividad de este intercambiador, aunque sí que se ha descrito una acción positiva indirecta, mediada por la fosforilación de CFTR, que sería quien finalmente interaccionase con SLC26A6.¹⁸⁸ Así pues, no parece probable que en los conductos pancreáticos de ratones CF, que por definición carecen de CFTR, la PKA tenga ninguna acción positiva sobre el SLC26A6. En ratones normales, la inhibición de la PKA evitaría la fosforilación y activación del CFTR, de forma que la falta de interacción entre este y el

SLC26A6 podría contribuir a la reducción que observamos en su respuesta secretora en los experimentos en los que se utilizó el H-89.

Así pues, la explicación de nuestros resultados requeriría asumir que las acciones de la PKA se ejercen al mismo tiempo sobre varios transportadores de membrana diferentes; esta sería la única posibilidad para explicar la inhibición que observamos tanto en la secreción de Cl^- como en la dependiente de HCO_3^- . Obviamente, estos mecanismos, de existir, también deberían estar presentes en los animales normales y contribuirían a la inhibición de la secreción que provoca el tratamiento con H-89.

Como hemos mencionado previamente, para explicar nuestros resultados debemos considerar también la existencia, tanto en ratones normales como CF, de mecanismos cuya estimulación por el cAMP no dependa de la activación de la PKA. Hasta el momento se han descrito dos posibles vías de actuación del cAMP intracelular independientes de la PKA. En primer lugar, el cAMP puede activar directamente canales catiónicos inespecíficos, mecanismo que, por ejemplo, es responsable de la transducción del estímulo en neuronas olfatorias.²⁷¹ La segunda consiste en la activación, por el cAMP, de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de la proteína G monomérica Rap1, las proteínas Epac.⁷⁶

En células ductulares pancreáticas de rata se describió hace años la presencia de canales catiónicos inespecíficos, tanto en su membrana basolateral como en la luminal.¹¹² La intervención de estos canales como efectores del cAMP es, sin embargo, muy dudosa: por una parte, se ha demostrado que estos canales se activan únicamente en presencia de concentraciones muy elevadas de Ca^{2+} citosólico;¹¹² por otra parte, aunque el cAMP regulase este tipo de canales, parece difícil relacionar un incremento en la conductancia basolateral y luminal a cationes con una estimulación de la secreción de agua y electrolitos en estas células.

A la vista de lo anteriormente expuesto, consideramos que la activación de la ruta iniciada por Epac es el mecanismo más probable para explicar el mantenimiento de una secreción hidroelectrolítica significativa en respuesta al cAMP, que es independiente de la activación de la PKA. La investigación de la posible contribución de esta ruta intracelular se abordará en un apartado posterior de este trabajo.

1.1.6. Efecto de la inhibición de la PKA con una concentración mayor de H-89 (50 μM) en conductos pancreáticos de ratones normales

Los resultados obtenidos hasta ahora indican que el bloqueo de la PKA con H-89 solo produce una inhibición parcial de la respuesta secretora de los conductos pancreáticos a forskolina. Como acabamos de discutir, estos resultados podrían explicarse por la existencia de algún mecanismo de transporte, cuya activación sea independiente de la fosforilación por PKA, que mantenga la secreción. Sin embargo, no podemos descartar que la concentración de H-89 utilizada en nuestro trabajo sea insuficiente para bloquear por completo la actividad de la PKA, tras su estimulación con forskolina. En principio, esta última explicación no parece probable, a la vista de los datos que se pueden encontrar en la bibliografía acerca de la eficacia de este bloqueante;^{60,334} sin embargo, y con el fin de investigar esta posibilidad, realizamos algunos experimentos utilizando una concentración cinco veces mayor del inhibidor, en conductos pancreáticos de ratones normales, estimulados con forskolina en tampón HCO_3^- .

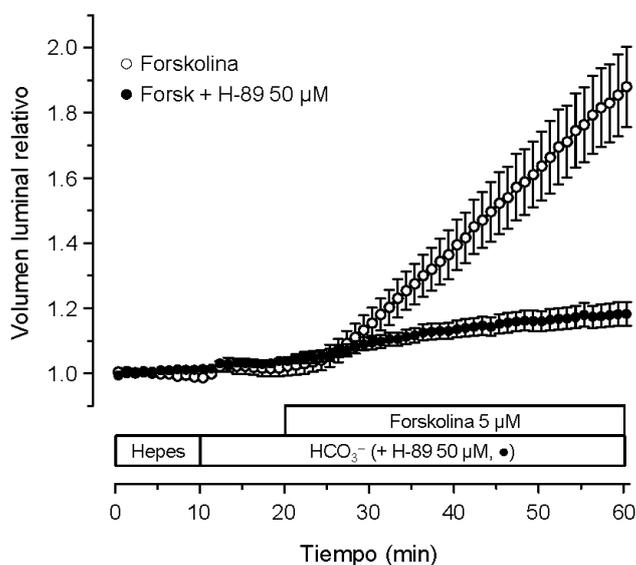


Figura 17. Efecto del bloqueo de la PKA con H-89 a la concentración de 50 μM sobre la secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- y estimulados con forskolina en ausencia (\circ , $n=17$) o en presencia de H-89 50 μM (\bullet , $n=17$). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

Los resultados muestran que el H-89, a la concentración de 50 μM , provoca una disminución progresiva en la pendiente del incremento del volumen luminal relativo en respuesta a forskolina (Figura 17).

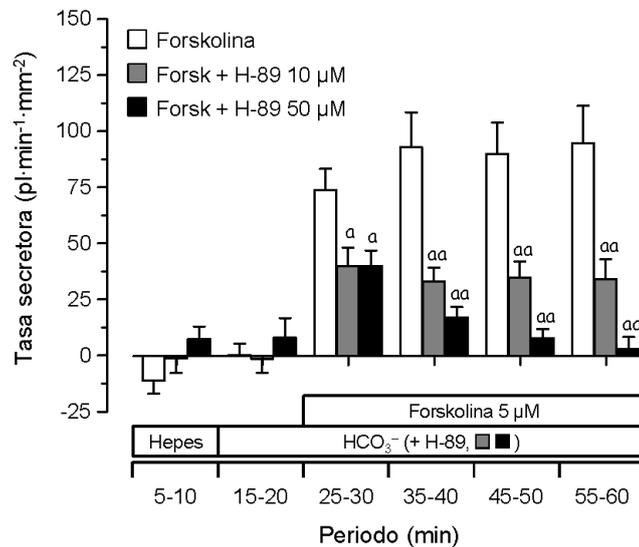


Figura 18. Efecto del bloqueo de la PKA con H-89 10 μM o 50 μM sobre la secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales. Tasa secretora en conductos pancreáticos perfundidos con solución HCO_3^- y estimulados con forskolina 5 μM en ausencia de bloqueante (\square , $n=17$), en presencia de H-89 10 μM (\blacksquare , $n=14$) o en presencia de H-89 50 μM (\blacksquare , $n=17$). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en las figuras 3 y 17 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del ANOVA fueron significativos en los periodos 25-30, 35-40, 45-50 y 55-60 ($P < 0.01$). Los resultados del test de Scheffé se muestran como "a" $P < 0.05$ y "aa" $P < 0.01$ con respecto a los conductos perfundidos en ausencia de H-89.

Con el fin de comparar el efecto de las dos concentraciones de H-89, hemos analizado las tasas secretoras de los conductos perfundidos en presencia de H-89 10 μM (ya mostradas en la Figura 4) y 50 μM (Figura 18). En la gráfica se observa que, como ya hemos descrito, el H-89 a la concentración de 10 μM ejerce una inhibición que se mantiene más o menos constante hasta el final del experimento. El patrón de respuesta observado al utilizar la concentración más alta del bloqueante de la PKA es diferente, ya que el H-89 50 μM inhibe la secreción de manera progresiva. En el periodo inmediatamente posterior a la adición de forskolina (25'-30'), la inhibición observada con H-89 50 μM es idéntica a la provocada por H-89 10 μM ; sin embargo, a medida que transcurre el experimento, la tasa secretora va disminuyendo más intensamente en presencia de H-89 50 μM . El bloqueo de la secreción

provocado por esta concentración alta del inhibidor es total en el último periodo analizado (55'-60'), en el que observamos valores de tasa secretora que no se diferencian significativamente de cero.

Los resultados obtenidos con H-89 a la concentración de 50 μM muestran una inhibición total de la respuesta secretora a forskolina en conductos pancreáticos de ratones normales que, sin embargo, y a diferencia de la observada con H-89 10 μM , se va alcanzando de forma progresiva a lo largo del tiempo del experimento. Podríamos pensar que la inhibición provocada por la concentración más baja del bloqueante no es completa porque resulta insuficiente en nuestras condiciones experimentales. Alternativamente, no podemos descartar que el H-89, a concentraciones elevadas, produzca algún efecto tóxico y/o inespecífico que sea responsable de esta inhibición total. De hecho, se ha descrito que altas concentraciones de H-89 pueden inhibir la actividad de numerosas cinasas diferentes de la PKA.²¹⁴

1.1.7. Efecto de la inhibición de la actividad de la PKA tras la estimulación de la secreción con carbacol en conductos pancreáticos de ratones normales

Con el fin de comprobar si el bloqueo producido por H-89 50 μM en la respuesta secretora a forskolina se debe a su efecto específico sobre la PKA, realizamos una serie de experimentos en conductos procedentes de ratones normales, en los que utilizamos carbacol como estimulante de la secreción. Este agonista colinérgico actúa sobre la secreción ductular pancreática a través de la ruta del Ca^{2+} citosólico y por la activación de la proteína cinasa C (PKC),¹⁹ es decir, por mecanismos independientes de la activación de la PKA.

La adición de carbacol 30 μM al medio de perfusión (tampón HCO_3^-) provoca un modesto pero claro incremento en el volumen luminal relativo de los conductos pancreáticos, tanto en ausencia como en presencia de H-89 10 μM (Figura 19). En trabajos previos de nuestro grupo ya habíamos descrito que la respuesta secretora al carbacol, a diferencia de la inducida por forskolina, es transitoria, con un incremento del volumen luminal relativo mucho más marcado inmediatamente después de la aplicación del agonista y una tendencia posterior a mantener valores más estables.²⁵⁶ En cuanto a las tasas secretoras observadas tras la estimulación con carbacol, en ausencia de inhibidor, encontramos que los valores máximos, cercanos a 100

$\text{pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$, se obtienen en el periodo 22'-27'. Estos valores no se modifican de manera significativa en presencia de H-89 $10\ \mu\text{M}$ (Figura 21).

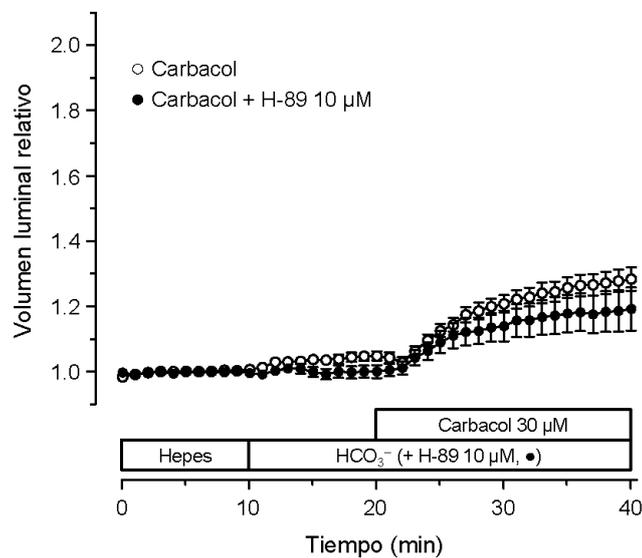


Figura 19. Efecto del bloqueo de la PKA sobre la secreción estimulada por carbacol en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- y estimulados con carbacol $30\ \mu\text{M}$ en ausencia (\circ , $n=39$) o en presencia de H-89 $10\ \mu\text{M}$ (\bullet , $n=10$). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

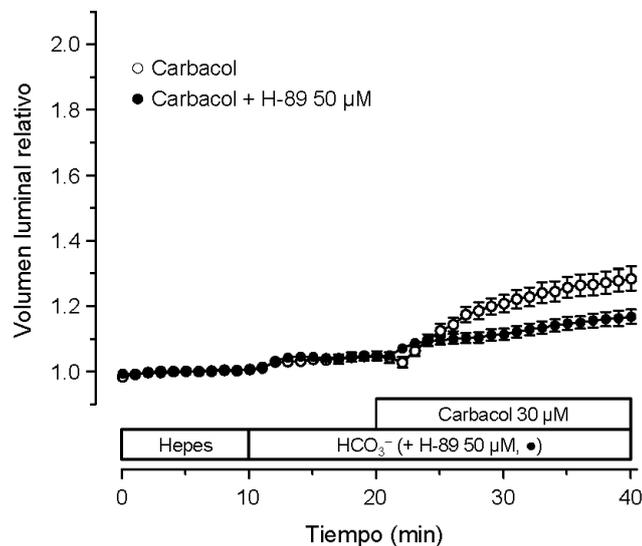


Figura 20. Efecto del bloqueo de la PKA con H-89 a la concentración de $50\ \mu\text{M}$ sobre la secreción estimulada por carbacol en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- y estimulados con carbacol $30\ \mu\text{M}$ en ausencia (\circ , $n=39$) o en presencia de H-89 $50\ \mu\text{M}$ (\bullet , $n=35$). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

Al analizar el efecto del H-89 50 μM observamos que, a diferencia de lo que ocurre cuando se usa a la concentración más baja, este inhibe parcialmente el incremento en el volumen luminal relativo de los conductos tras la estimulación con carbacol (Figura 20). Del mismo modo, comprobamos que el H-89 50 μM reduce de forma significativa la tasa secretora obtenida inmediatamente después de la estimulación con carbacol, en el periodo 22'-27' (Figura 21).

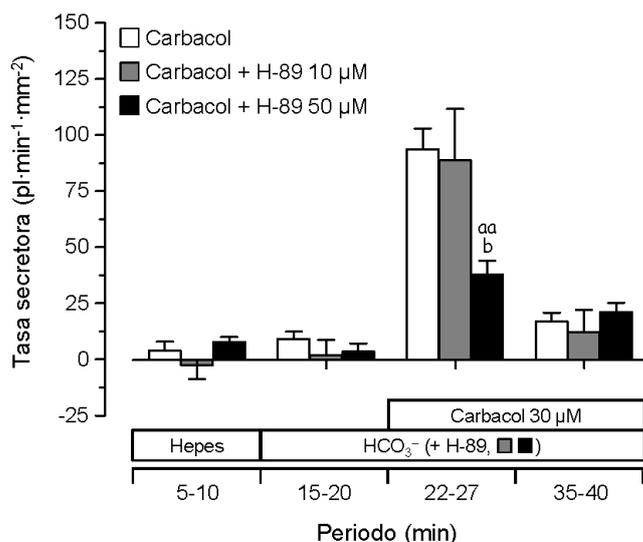


Figura 21. Efecto del bloqueo de la PKA con H-89 10 μM o 50 μM sobre la secreción estimulada por carbacol en conductos pancreáticos de ratones normales. Tasa secretora en conductos pancreáticos perfundidos con solución HCO_3^- y estimulados con carbacol 30 μM en ausencia de bloqueante (\square , n=39), en presencia de H-89 10 μM (\blacksquare , n=10) o de H-89 50 μM (\blacksquare , n=35). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en las figuras 19 y 20 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del ANOVA fueron significativos en el periodo 22-27 ($P < 0.01$). Los resultados del test de Scheffé se muestran como "aa" $P < 0.01$ con respecto a los conductos perfundidos en ausencia de bloqueante, y "b" $P < 0.05$ con respecto a los conductos perfundidos con H-89 10 μM .

Como hemos mencionado, la respuesta secretora al carbacol no implica la participación de la PKA. Por ello, es lógico que el H-89, a la concentración más baja utilizada, no modifique significativamente la respuesta secretora a este agonista colinérgico; en contraste, la inhibición observada en presencia de H-89 50 μM apunta hacia una acción inespecífica y/o tóxica de este bloqueante, acciones que se han descrito en la bibliografía.²¹⁴

A la vista de estos resultados obtenidos con carbacol, la inhibición total producida por el H-89 50 μM en la respuesta a la forskolina podría deberse, de igual manera, a un efecto de esta

sustancia sobre dianas diferentes de la PKA y, en consecuencia, consideramos que los resultados obtenidos con esta concentración del bloqueante no son útiles a la hora de obtener conclusiones acerca del efecto de la inhibición de esta cinasa.

1.2. Análisis de la respuesta secretora en conductos pancreáticos de ratones normales a agonistas selectivos de PKA o de Epac

Una de las principales limitaciones en el estudio de las acciones del cAMP es la baja permeabilidad de la membrana plasmática para esta molécula. Actualmente, disponemos de análogos del cAMP que pueden entrar en la célula con cierta facilidad; además, en los últimos años, se han desarrollado análogos de esta molécula capaces de activar de forma selectiva a la PKA o a las proteínas Epac, de forma que es posible analizar las acciones de ambos efectores intracelulares por separado.

Hasta el momento, nuestros resultados indican que la activación de la PKA no es responsable de la totalidad de la respuesta secretora de los conductos a la forskolina, tanto en lo que respecta a la secreción de Cl^- como a la secreción dependiente de HCO_3^- . Con el fin de investigar si parte del efecto de la forskolina sobre la secreción ductular está mediado por la activación de la vía de Epac y Rap1, hemos analizado el efecto de un análogo del cAMP que activa selectivamente esta ruta, el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT), sobre la secreción hidroelectrolítica de los conductos. Además, hemos comparado su efecto con el de otro análogo del cAMP, el N⁶-Benzoil-cAMP (6-Bnz), que activa de forma específica a la PKA. Todos los experimentos recogidos en este apartado se realizaron utilizando ratones normales, de la cepa CD1.

1.2.1. Respuesta secretora de los conductos pancreáticos de ratón a N⁶-Benzoil-cAMP

En primer lugar, con el fin de analizar la respuesta secretora de los conductos pancreáticos de ratones normales al 6-Bnz, que actúa de forma selectiva sobre la PKA, realizamos una serie de experimentos utilizando dos concentraciones distintas de este análogo, 100 μM y 200 μM .

Los resultados obtenidos en el análisis del volumen luminal relativo se muestran en las Figuras 22 y 23. Como se puede observar en las gráficas, la estimulación con 6-Bnz, a las dos

concentraciones utilizadas, en tampón HCO_3^- , provoca un ligero incremento en el volumen luminal relativo de los conductos con respecto al control.

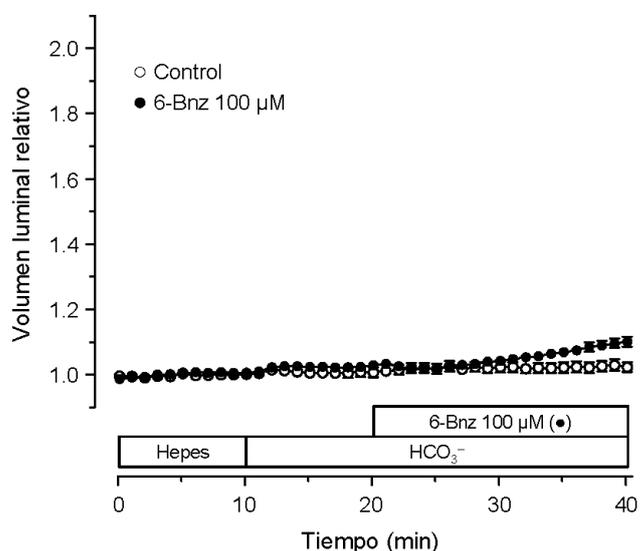


Figura 22. Secreción estimulada por N^6 -Benzoil-cAMP a la concentración de $100 \mu\text{M}$ en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- en ausencia (○, n=15) o en presencia de 6-Bnz $100 \mu\text{M}$ (●, n=46). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

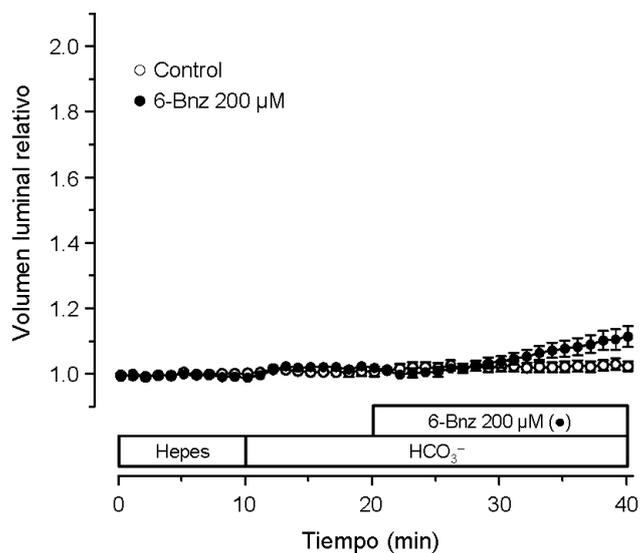


Figura 23. Secreción estimulada por N^6 -Benzoil-cAMP a la concentración de $200 \mu\text{M}$ en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- en ausencia (○, n=15) o en presencia de 6-Bnz $200 \mu\text{M}$ (●, n=24). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

Este incremento en la secreción ductular en respuesta a 6-Bnz se observa también al analizar las tasas secretoras (Figura 24). En presencia de 6-Bnz, a las concentraciones de 100 μM o 200 μM , se produce una estimulación de la tasa de secreción de fluido en los últimos periodos del experimento. En ambos casos, la tasa secretora de los conductos, tras la estimulación con el análogo, alcanza valores de entre 30 y 35 $\text{pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$. El análisis estadístico de los resultados muestra que los valores obtenidos tras la estimulación con 6-Bnz 100 μM y 200 μM fueron significativamente superiores a los alcanzados en ausencia del análogo. Además, las tasas secretoras tras la estimulación con cualquiera de las concentraciones de 6-Bnz son significativamente mayores que cero, según el test de la *t* de Student con respecto a la media poblacional, y no se observaron diferencias significativas entre ellas.

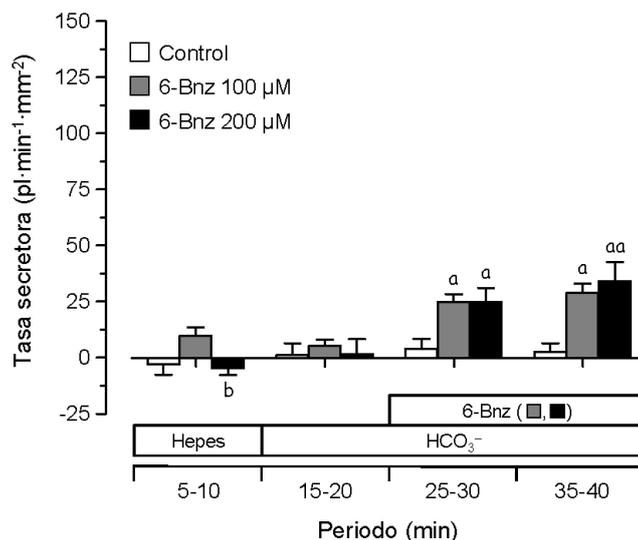


Figura 24. Secreción estimulada por N⁶-Benzoil-cAMP 100 μM o 200 μM en conductos pancreáticos de ratones normales. Tasa secretora en conductos pancreáticos perfundidos con solución HCO_3^- , sin estímulo (\square , n=15), con 6-Bnz 100 μM (\square , n=46) o con 6-Bnz 200 μM (\blacksquare , n=24). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en las figuras 22 y 23 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del ANOVA fueron significativos en los periodos 5-10 y 25-30 ($P < 0.05$), y en el periodo 35-40 ($P < 0.01$). Los resultados del test de Scheffé se muestran como "a" $P < 0.05$ y "aa" $P < 0.01$ con respecto conductos perfundidos en ausencia de estímulo y "b" $P < 0.05$ con respecto a los conductos estimulados con 6-Bnz 100 μM .

En los conductos pancreáticos de ratones normales, la activación de la PKA debería provocar una intensa respuesta secretora. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la respuesta al análogo específico de la PKA es muy moderada en nuestro modelo experimental: se alcanzan

tasas secretoras del orden de $30 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$, frente a los más de $100 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$ que típicamente se obtienen tras la estimulación con forskolina. La compañía que comercializa este producto asegura que la permeabilidad de la membrana plasmática para esta molécula es aproximadamente 6.5 veces superior que para el cAMP; a efectos comparativos, la permeabilidad de la membrana para un análogo del cAMP frecuentemente utilizado en investigación, el 8-Br-cAMP, es del orden de 2 veces mayor que para el cAMP, mientras que para el dibutilil-cAMP es más de 20 veces superior. Desde este punto de vista, la acción moderada del 6-Bnz sobre la secreción ductular no se debería adscribir a la baja permeabilidad de las células para este compuesto.

1.2.2. Respuesta secretora de los conductos pancreáticos de ratón a 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP

En experimentos similares a los realizados con 6-Bnz, los conductos pancreáticos de ratones normales se expusieron al análogo 8-pCPT que, como ya hemos mencionado, activa de forma selectiva a las proteínas Epac. Este análogo se añadió a la solución HCO_3^- , a una concentración final de $100 \mu\text{M}$.

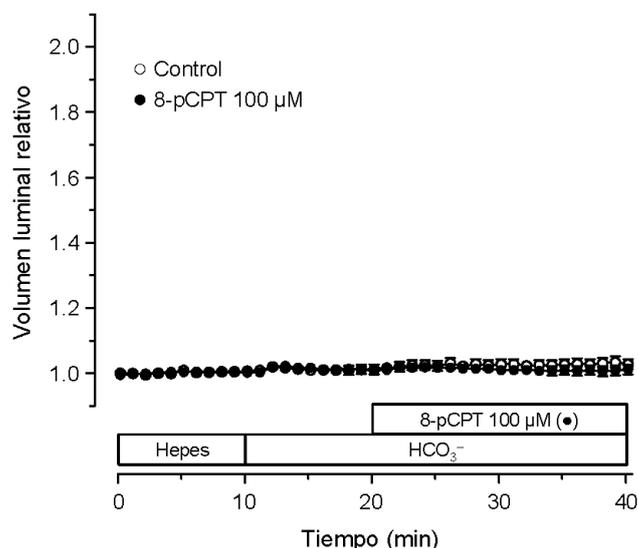


Figura 25. Secreción en presencia de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP a la concentración de $100 \mu\text{M}$ en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- en ausencia (\circ , $n=15$) o en presencia de 8-pCPT $100 \mu\text{M}$ (\bullet , $n=53$). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

Los resultados obtenidos en el análisis del volumen luminal relativo se muestran en la Figura 25. La gráfica obtenida para los conductos perfundidos con 8-pCPT es muy similar a la obtenida en ausencia del análogo, sin que se aprecie ningún cambio en la secreción hidroelectrolítica en conductos pancreáticos de ratón expuestos a esta sustancia.

El análisis de las tasas secretoras (Figura 26) permite llegar a la misma conclusión, es decir, que la adición de 8-pCPT al medio de perfusión no induce respuesta secretora alguna en los conductos pancreáticos. Así, las tasas secretoras observadas en los conductos perfundidos en presencia del análogo no son significativamente distintas a cero, y son similares a las obtenidas en conductos perfundidos con solución HCO_3^- en ausencia del análogo.

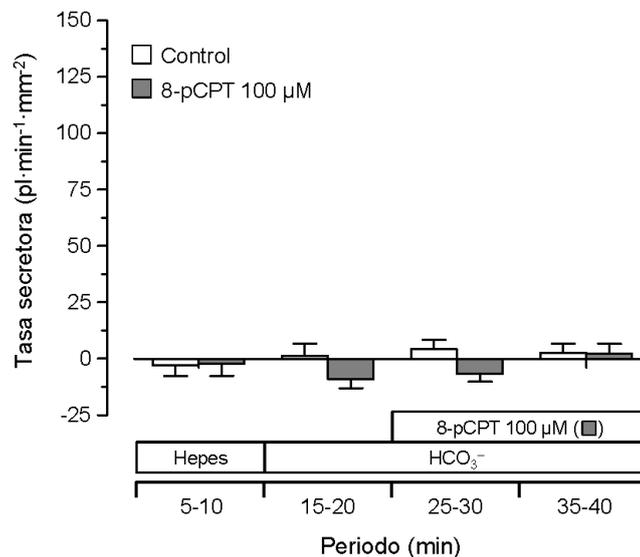


Figura 26. Secreción en presencia de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP 100 μM en conductos pancreáticos de ratones normales. Tasa secretora en conductos pancreáticos perfundidos con solución HCO_3^- , en ausencia (\square , n=15) o en presencia de 8-pCPT 100 μM (\blacksquare , n=53). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 25 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas.

Los resultados obtenidos con el 8-pCPT parecen indicar que esta molécula y, por lo tanto, la activación de las proteínas Epac, no induce ninguna respuesta secretora en conductos pancreáticos de ratón. Este análogo del cAMP selectivo para Epac se ha utilizado en diversos trabajos en los que se han demostrado acciones biológicas mediadas por la activación de Epac/Rap1, en varios tipos celulares, a concentraciones similares o incluso inferiores a la utilizada en nuestros experimentos.^{85,171,304} En este caso, la casa comercial afirma que la

permeabilidad de la membrana plasmática para este compuesto es cerca de 70 veces mayor que su permeabilidad para el cAMP, de forma que, en principio, no parecería probable que este factor fuese limitante.

En contraste con lo anteriormente expuesto, últimamente se está poniendo en duda la utilidad de esta molécula y, de hecho, recientemente se han desarrollado derivados acetoximetil éster (AM) de la misma, con el fin de mejorar su capacidad de entrada a las células.³⁶³ En un trabajo reciente, Chepurny *et al.*⁵⁸ han descrito la falta de efectos del 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP a la concentración de 100 μM (la utilizada por nosotros) en la secreción de insulina en una línea celular derivada de células β pancreáticas de rata, mientras que una concentración mucho menor del derivado AM, 10 μM , fue suficiente para provocar una notable respuesta secretora en ese mismo modelo. Esta misma concentración del derivado también estimuló significativamente la secreción de insulina en islotes pancreáticos de ratón.⁵⁸ Se ha descrito que el 8-pCPT-AM es del orden de 500 veces más potente que el 8-pCPT, y que esta diferencia reside precisamente en su capacidad para atravesar la membrana plasmática.¹⁷⁷

1.2.3. Respuesta secretora de los conductos pancreáticos de ratón a elevadas concentraciones de los análogos del cAMP

Nuestro principal objetivo en los experimentos con análogos del cAMP ha sido investigar si la activación de Epac tiene alguna consecuencia en la secreción de los conductos pancreáticos. Los experimentos con 6-Bnz se realizaron como control positivo de estos estudios ya que, como hemos mencionado, la activación de la PKA debería provocar una intensa respuesta secretora. Lo que hemos observado en nuestros resultados es una respuesta secretora muy moderada al agonista selectivo de la PKA, el 6-Bnz, y una falta de respuesta al de Epac, el 8-pCPT.

Como acabamos de revisar, la permeabilidad de la membrana puede no ser lo suficientemente elevada como para permitir que estos análogos alcancen concentraciones eficaces en el citosol. Para investigar esta posibilidad, nos planteamos aumentar de forma considerable la concentración de los análogos en los experimentos. En nuestro sistema, los conductos se perfunden continuamente a una velocidad de $1.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, por lo que el uso de concentraciones elevadas de los análogos resulta inviable desde un punto de vista estrictamente económico. Por

esta razón, y con el fin de poder aplicar concentraciones más altas de los análogos, realizamos una serie de experimentos en los que cambiamos las condiciones de perfusión: en estos experimentos, los conductos se perfundieron con HEPES durante 10 minutos, y a continuación con tampón HCO_3^- durante otros 10 minutos. En el minuto 20 del experimento se paró la perfusión y se rellenó la cámara, cuya capacidad es de $150 \mu\text{l}$, con tampón HCO_3^- al que se habían añadido los análogos a una concentración final de 1 mM . El estímulo se mantuvo durante 20 minutos, con el flujo parado, y a continuación se terminó el experimento perfundiendo con la solución hipotónica.

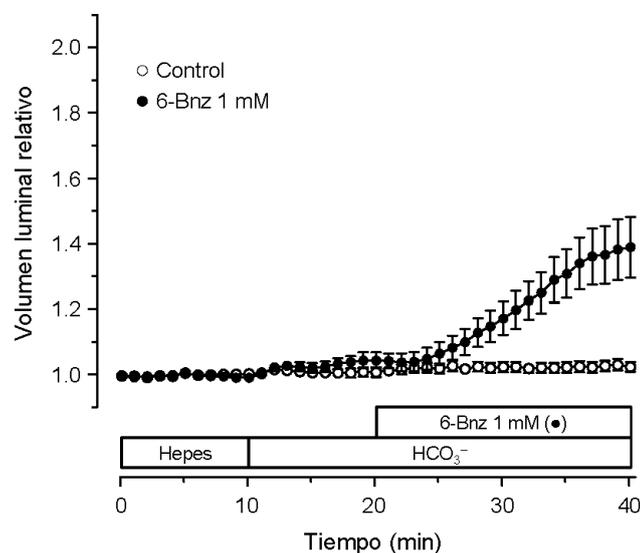


Figura 27. Secreción estimulada por N^6 -Benzoil-cAMP a la concentración de 1 mM en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- en ausencia (\circ , $n=15$) o en presencia de $6\text{-Bnz } 1 \text{ mM}$ (\bullet , $n=18$). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

Los resultados obtenidos en estas condiciones muestran que el $6\text{-Bnz } 1 \text{ mM}$ aumenta considerablemente el volumen luminal relativo de los conductos pancreáticos con respecto al control; sin embargo, este incremento no es sostenido, ya que se puede observar una marcada reducción en su pendiente en los últimos 5 minutos del experimento (Figura 27). El análisis de las tasas secretoras confirma el mismo efecto, es decir, la secreción de fluido en respuesta a $6\text{-Bnz } 1 \text{ mM}$ en los periodos $25'\text{-}30'$ y $35'\text{-}40'$ es significativamente más alta que la obtenida al perfundir los conductos en ausencia del análogo, alcanzándose tasas secretoras del orden de $80 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$, bastante cercanas a las que se pueden obtener tras la estimulación con

forskolina. Además, se observa que los valores de secreción en el último periodo (35'-40') son netamente menores que en el anterior (25'-30') (Figura 28).

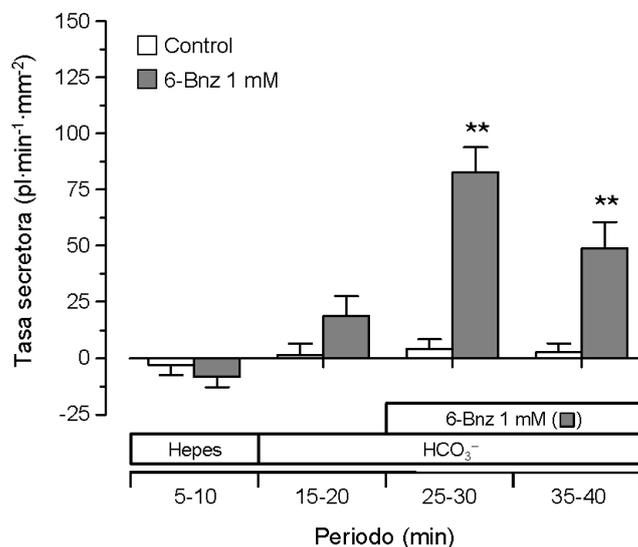


Figura 28. Secreción estimulada por N⁶-Benzoil-cAMP 1 mM en conductos pancreáticos de ratones normales. Tasa secretora en conductos pancreáticos perfundidos con solución HCO₃⁻, en ausencia (□, n=15) o en presencia de 6-Bnz 1 mM (■, n=18). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 27 y se expresan como media ± S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como ** P < 0.01 con respecto a los conductos perfundidos en ausencia de estímulo.

A la vista de estos resultados, parece claro que se necesita una concentración muy elevada del agonista selectivo de la PKA para obtener la esperada respuesta secretora en nuestro modelo experimental; esto hace pensar que, efectivamente, cuando los conductos se perfunden con concentraciones bajas de 6-Bnz (100 o 200 μM), la permeabilidad de la membrana plasmática para esta molécula es demasiado baja como para que entre en las células en cantidad suficiente y ejerza sus acciones.

Las condiciones en las que se realizaron estos experimentos, con el flujo de perfusión parado, presentan algunos inconvenientes. Por ejemplo, a lo largo del tiempo, el tampón HCO₃⁻ presente en la cámara de perfusión irá perdiendo CO₂ hacia la atmósfera, lo que necesariamente implicará una cierta alcalinización del medio y una disminución de su concentración de HCO₃⁻. Tampoco la temperatura es fácilmente controlable en esta situación con nuestro sistema de perfusión. Quiere ello decir que los cambios que se ponen de

manifiesto al final del experimento, con una apreciable reducción en la tasa secretora, pueden ser consecuencia directa de un conjunto de factores incontrolables.

En las mismas condiciones experimentales, la presencia de 8-pCPT 1 mM durante 20 minutos induce inicialmente un pequeño incremento en el volumen luminal relativo de los conductos pancreáticos con respecto al control, que acaba disminuyendo ligeramente en los últimos minutos del experimento (Figura 29). Las tasas secretoras en presencia de este análogo, en el periodo 25'-30', alcanzan valores de alrededor de $20 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$, que son significativamente mayores que cero, según el test de la *t* de Student con respecto a la media poblacional; sin embargo, no encontramos diferencias significativas con respecto al grupo control. La situación se invierte en el último periodo analizado (35'-40'), en el que hay una reabsorción neta de fluido desde el lumen ductular, que también resulta significativamente diferente de cero, aunque tampoco es significativamente diferente del correspondiente valor en el grupo control (Figura 30). Esta reabsorción tiene lugar en el mismo periodo en el que el efecto del 6-Bnz 1 mM estaba ya claramente disminuido, por lo que también podría achacarse a la falta de control de las condiciones experimentales en el protocolo utilizado para analizar los efectos de elevadas concentraciones de los análogos del cAMP.

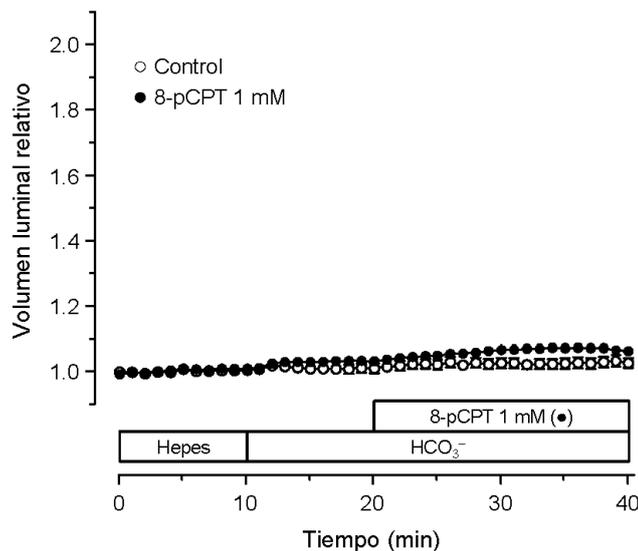


Figura 29. Secreción en presencia de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP a la concentración de 1 mM en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- en ausencia (\circ , $n=15$) o en presencia de 8-pCPT 1 mM (\bullet , $n=55$). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

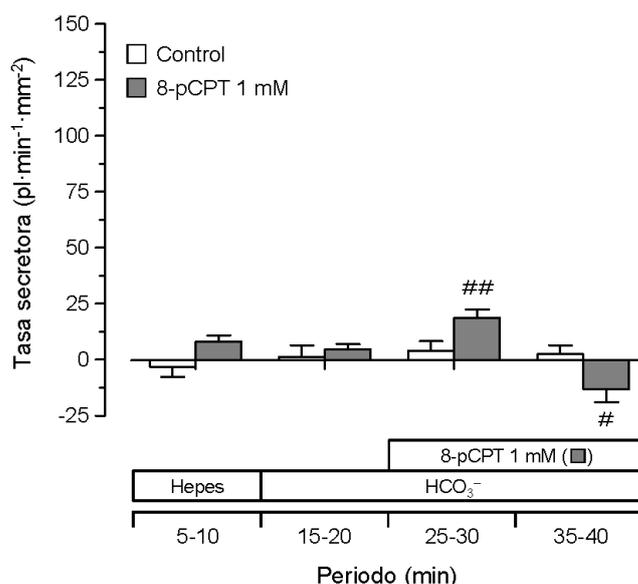


Figura 30. Secreción en presencia de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP 1 mM en conductos pancreáticos de ratones normales. Tasa secretora en conductos pancreáticos perfundidos con solución HCO_3^- , en ausencia (□, n=15) o en presencia de 8-pCPT 1 mM (■, n=55). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 29 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como # $P < 0.05$ y ## $P < 0.01$ respecto a cero.

A diferencia de lo que ocurría con el 6-Bnz, el uso de una concentración elevada de 8-pCPT (1 mM) no da lugar a una respuesta secretora apreciable. En todo caso, y aunque nuestros resultados no nos permiten ser concluyentes sobre este asunto, podemos considerar que el análogo del Epac sería capaz únicamente de estimular de forma muy débil la secreción de fluido en los conductos pancreáticos de ratón. Puesto que la permeabilidad de la membrana plasmática para este compuesto parece ser el factor limitante en nuestros experimentos, el uso de derivados acetoximetil éster de esta molécula, con mayor capacidad para entrar en las células, debería ayudar a resolver esta cuestión en el futuro.

1.2.4. Efectos de la acción conjunta del carbacol y el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre la secreción ductular en ratones

En estudios con acinos pancreáticos de rata se ha descrito que el análogo 8-pCPT, por sí solo, no tiene ningún efecto sobre la respuesta secretora acinar; sin embargo, este agonista sí que potencia el efecto estimulante de concentraciones fisiológicas del agonista colinérgico

carbacol, o de ceruleína.⁵⁵ Tomando como partida estos resultados, quisimos comprobar si el 8-pCPT modifica la respuesta secretora de los conductos estimulados con carbacol.

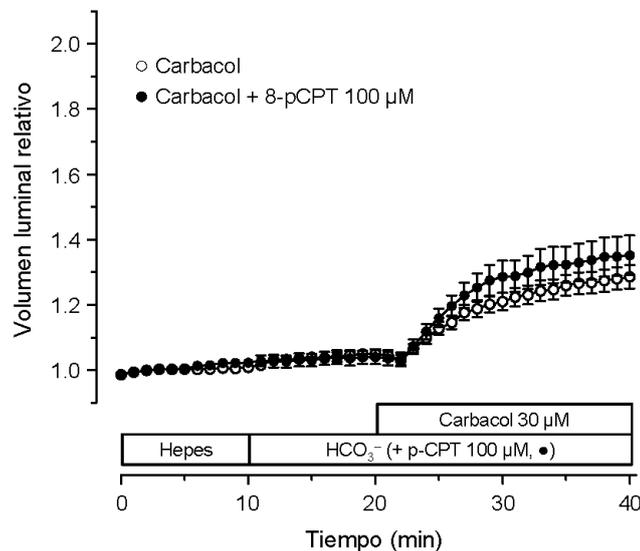


Figura 31. Efecto del 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP a la concentración de 100 μM sobre la secreción estimulada por carbacol en conductos pancreáticos de ratones normales. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con solución HCO_3^- y estimulados con carbacol 30 μM en ausencia (\circ , $n=39$) o en presencia de 8-pCPT 100 μM (\bullet , $n=22$). Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

El 8-pCPT 100 μM se añadió al tampón HCO_3^- , en su caso, 10 minutos antes de estimular la secreción con carbacol 30 μM . Nuestros resultados muestran que la pendiente del incremento del volumen luminal relativo de los conductos pancreáticos estimulados de forma conjunta con carbacol y 8-pCPT es mayor que la obtenida en presencia únicamente de carbacol (Figura 31). Del mismo modo, la tasa secretora máxima alcanzada tras la estimulación con carbacol, en el periodo 22'-27', aumenta de forma altamente significativa cuando este agonista se combina con el análogo de cAMP selectivo para Epac (Figura 32).

En contraste con la falta de efectos secretores directos del 8-pCPT en los conductos pancreáticos de ratón, estos experimentos nos permiten demostrar que la activación de la ruta intracelular iniciada por las proteínas Epac tiene como resultado la potenciación de la respuesta secretora al carbacol en nuestro modelo. La existencia de fenómenos de potenciación entre las rutas intracelulares del cAMP y del Ca^{2+} /PKC se conoce desde hace

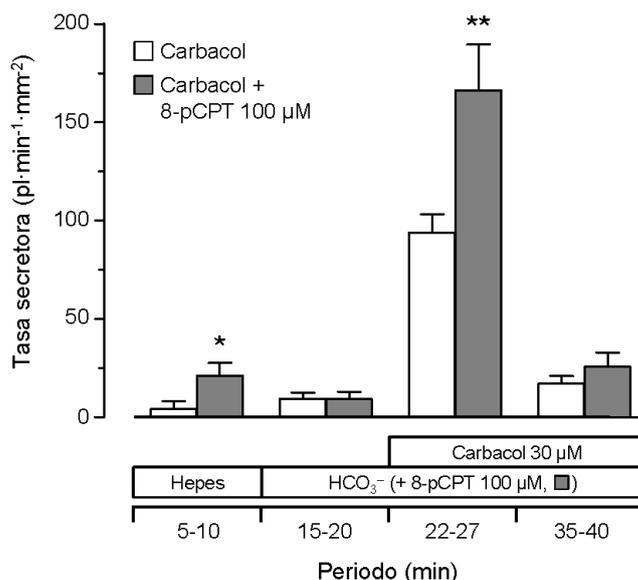


Figura 32. Efecto del 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP 100 μM sobre la secreción estimulada por carbaccol en conductos pancreáticos de ratones normales. Tasa secretora en conductos pancreáticos perfundidos con solución HCO₃⁻ y estimulados con carbaccol 30 μM en ausencia (□, n=39) o en presencia de 8-pCPT 100 μM (■, n=22). Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 31 y se expresan como media ± S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como * P < 0.05 y ** P < 0.01 con respecto a los conductos perfundidos en ausencia de 8-pCPT.

muchos años,³¹⁶ si bien los mecanismos moleculares implicados en estos procesos todavía no se han aclarado. Tras el descubrimiento de las proteínas Epac como efectores intracelulares del cAMP, se está dedicando bastante atención a su posible intervención en las interacciones entre ambas rutas de señalización. Podemos afirmar, a la vista de nuestros resultados, que existe algún tipo de interacción entre la ruta de señalización activada por el carbaccol y la iniciada con la activación de las proteínas Epac, de forma similar a lo descrito por Chaudhuri *et al.*⁵⁵ en células acinares pancreáticas de rata.

Aunque no estamos todavía en condiciones de ofrecer más datos acerca de cómo tienen lugar estos procesos en las células ductulares del páncreas de ratón, hay bastantes trabajos que relacionan la activación de Epac con la ruta del Ca²⁺ citosólico libre. Más en concreto, se ha descrito, en diversos tipos celulares, acciones de los efectores de Epac sobre los receptores de rianodina en los depósitos intracelulares de Ca²⁺.^{147,295,318,382} Se ha descrito, en células β pancreáticas, que Epac puede modular los receptores de rianodina, e incrementar la liberación

de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ,^{171,172} un fenómeno de este tipo podría explicar la potenciación de la respuesta al carbacol cuando simultáneamente se activa a Epac.

Que este fenómeno de potenciación se ponga de manifiesto en experimentos en los que utilizamos 8-pCPT a la concentración de 100 μM , con la que no habíamos observado ninguna respuesta secretora, puede indicar que basta con una activación muy moderada de Epac para que se produzca una potenciación significativa de las acciones estimulantes del carbacol.

2. ESTUDIOS EN ACINOS PANCREÁTICOS AISLADOS DE RATONES NORMALES Y CF

En la especie humana, la fibrosis quística provoca la falta de secreción de fluido y electrolitos por parte de las células ductulares y, secundariamente, graves alteraciones en el funcionamiento de las células acinares pancreáticas. Como hemos descrito anteriormente, los conductos pancreáticos de ratones CF mantienen una secreción residual, lo que podría prevenir las alteraciones patológicas en el páncreas. Con el fin de evaluar la funcionalidad de las células acinares en este modelo de ratón, hemos analizado la secreción enzimática y los cambios en la concentración de calcio citosólico libre, en respuesta a CCK-8 o carbacol, en acinos pancreáticos aislados.

2.1. Análisis de la secreción de amilasas

La secreción de amilasas se analizó en acinos pancreáticos aislados, de ratones normales y CF, incubados en ausencia de estímulo o en presencia de distintas concentraciones de CCK-8 o carbacol, siguiendo el método descrito en el apartado de *Materiales y Métodos*.

Nuestros resultados muestran que la tasa de secreción de amilasas en respuesta a las distintas concentraciones de CCK-8 y de carbacol es mayor que la obtenida en situación basal (Figuras 33 y 34). En la respuesta a CCK-8, no encontramos la típica curva bifásica que caracteriza a la respuesta secretora de los acinos de rata, tras su exposición a

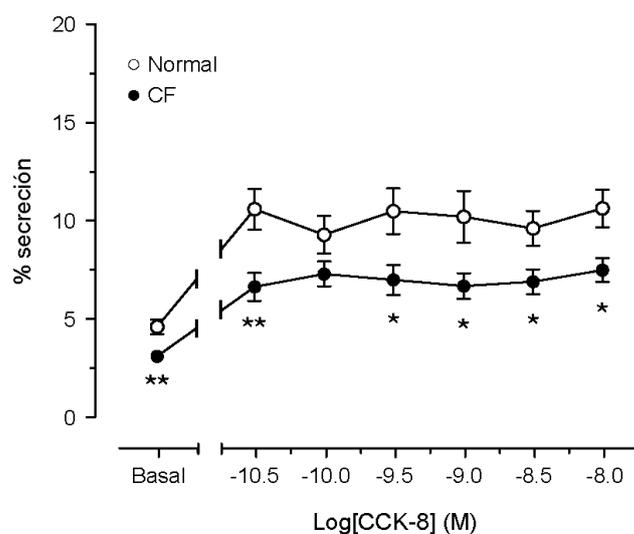


Figura 33. Respuesta secretora a CCK-8 en acinos pancreáticos aislados de ratones normales y CF. Secreción de amilasas en situación basal y tras la estimulación con concentraciones crecientes de CCK-8 en acinos aislados de ratones normales (○, n=13) y de ratones CF (●, n=11). Los valores son la media ± S.E.M. y se expresan como porcentaje de amilasas secretadas con respecto al contenido total de estas enzimas en los acinos. Los resultados del test de la t de Student se muestran como * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ con respecto la secreción en acinos de ratones normales.

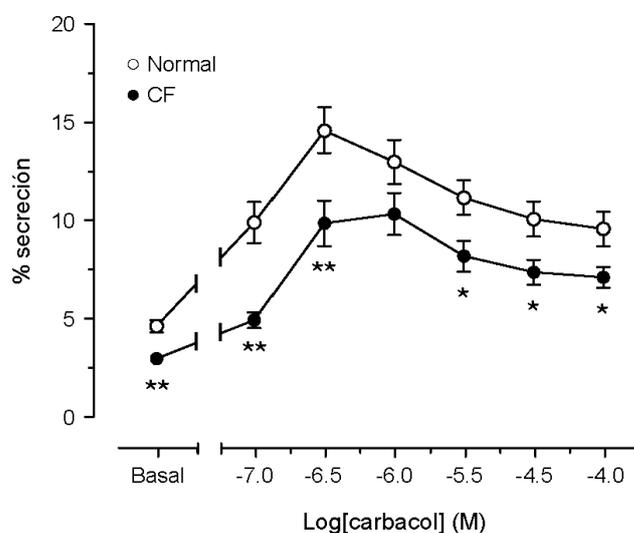


Figura 34. Respuesta secretora a carbacol en acinos pancreáticos aislados de ratones normales y CF. Secreción de amilasas en situación basal y tras la estimulación con concentraciones crecientes de carbacol en acinos aislados de ratones normales (○, n=15) y de ratones CF (●, n=14). Los valores son la media ± S.E.M. y se expresan como porcentaje de amilasas secretadas con respecto al contenido total de estas enzimas en los acinos. Los resultados del test de la t de Student se muestran como * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ con respecto la secreción en acinos de ratones normales.

concentraciones crecientes de CCK-8¹⁰³ (Figura 33); sin embargo, sí encontramos dicho perfil en la respuesta a carbacol (Figura 34). En cualquier caso, ambos secretagogos estimulan la secreción acinar, tanto de ratones normales como de ratones CF (Figuras 33 y 34).

Al comparar los resultados obtenidos en los dos grupos de animales, comprobamos que la secreción basal de amilasas en acinos de ratones CF es significativamente menor que la obtenida para acinos de ratones normales. Además, la respuesta secretora observada tras la estimulación, tanto con CCK-8 como con carbacol, es también menor en estos animales (Figuras 33 y 34). Estas diferencias son significativas para la mayor parte de las concentraciones de secretagogo utilizadas (Figuras 33 y 34).

En la especie humana, la fibrosis quística suele llevar asociados fenómenos de destrucción del tejido acinar pancreático, con el consiguiente desarrollo de insuficiencia pancreática.²⁰¹ Estas alteraciones se han interpretado clásicamente como acontecimientos secundarios a la falta de secreción hidroelectrolítica en el componente ductular del páncreas exocrino.¹²⁶ Sin embargo, el descubrimiento de que las células acinares del páncreas del conejo expresan la proteína CFTR,¹⁹¹ observación que se ha comprobado también en ratas y ratones, especies en las que además se ha localizado esta proteína en la membrana luminal de las células acinares, permiten postular la existencia de un efecto directo de la falta de este canal aniónico sobre la secreción enzimática.³⁸⁴

Como hemos revisado en el apartado de *Introducción*, los diferentes modelos de ratones CF muestran una considerable variabilidad en cuanto a sus manifestaciones fenotípicas.¹²⁴ Hasta la fecha, nadie ha estudiado la funcionalidad de las células acinares en la cepa $Cftr^{tm1Cam}$, utilizada en nuestro trabajo; sin embargo, sí que se han realizado estudios en los que se ha analizado la secreción enzimática en acinos pancreáticos aislados de animales de la cepa $Cftr^{tm1Unc}$, en los que no se ha observado ninguna modificación significativa en la respuesta secretora a diferentes agonistas.^{74,94,342} En otras cepas de ratones CF se ha observado atrofia acinar progresiva a medida que aumentaba la edad de los animales,^{130,249} cosa que no ocurre en la cepa $Cftr^{tm1Cam}$.²⁶⁹

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo demuestran que la secreción de amilasas, tanto en situación basal como en respuesta a CCK-8 y carbacol, se reduce de forma significativa en

los acinos de ratones CF, lo que indica que hay alteraciones derivadas de la falta de CFTR que, sin embargo, no llegan a provocar manifestaciones patológicas en el páncreas de estos animales. Freedman *et al.*⁹⁴ han descrito que, en ratones $Cftr^{tm1Unc}$, la secreción reducida de HCO_3^- provoca la acidificación y dilatación del lumen acinar, por alteraciones en los procesos de endocitosis, necesarios para la adecuada recirculación de las membranas celulares. No parece probable que esta sea la causa de nuestros resultados, por al menos tres motivos. En primer lugar, estas alteraciones en la endocitosis se observaron en un trabajo en el que, simultáneamente, se observó que, en los acinos pancreáticos de ratones $Cftr^{tm1Unc}$, no había cambios significativos en la secreción enzimática.⁹⁴ En segundo lugar, hemos podido comprobar que en nuestros animales se mantiene una secreción considerable de HCO_3^- , que no sería compatible con una disminución significativa del pH del contenido del árbol ductal. Por último, en la cepa $Cftr^{tm1Cam}$ no se observa la dilatación del lumen de los acinos que caracteriza a la $Cftr^{tm1Unc}$.^{93,269}

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, creemos que la interpretación de nuestros resultados en los acinos pancreáticos aislados de ratones CF debe centrarse más bien en modificaciones directas de la funcionalidad de las células acinares como consecuencia de la falta de CFTR. En definitiva, observamos, en la secreción de enzimas del componente acinar del páncreas exocrino de nuestros ratones CF, resultados similares a los obtenidos en la secreción ductular: ambas secreciones están significativamente reducidas con respecto a la de animales normales, pero se mantiene en ambos casos una capacidad secretora considerable, que podría explicar la casi total ausencia de manifestaciones patológicas en el páncreas de estos animales.

2.2. Medida de la concentración de calcio citosólico libre

El incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico libre es un acontecimiento clave en los procesos de señalización intracelular activados por la CCK y por el carbacol, que finalmente provocan la liberación de enzimas, por exocitosis, en las células acinares pancreáticas. A la vista de la disminución significativa en la secreción de amilasas que hemos observado en los acinos procedentes de ratones CF, hemos realizado, en esta misma preparación experimental, estudios de medida de la concentración de calcio citosólico libre, en respuesta a distintas

concentraciones de CCK-8 y carbacol, con el fin de investigar si los cambios secretores son consecuencia de alteraciones en esta ruta de señalización.

En las Figuras 35 y 36 se muestran algunos registros representativos de la $[Ca^{2+}]_c$ a lo largo del tiempo, obtenidos para acinos pancreáticos de ratones normales y CF en respuesta a la estimulación con CCK-8 100 pM y 1 nM, (Figura 35) y con carbacol 1 μ M y 10 μ M (Figura 36). En todos los casos se puede observar el típico perfil de la respuesta de este parámetro, consistente en un rápido y marcado incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ inmediatamente después de aplicar el estímulo correspondiente y, a partir del pico máximo, una disminución gradual en los niveles de Ca^{2+} citosólico libre, que en todo caso se mantienen por encima de los basales hasta el final del experimento.

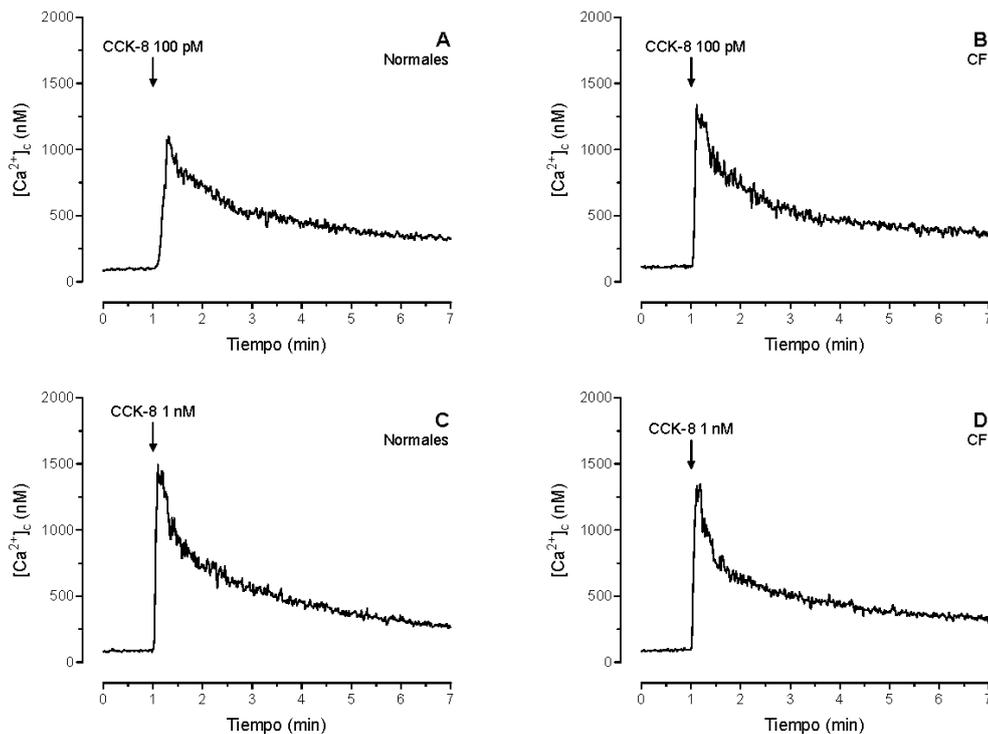


Figura 35. Concentración de calcio citosólico libre tras la estimulación con CCK-8 en acinos pancreáticos aislados de ratones normales y CF. Registros representativos de la concentración de calcio citosólico libre (nM) en respuesta a CCK-8 100 pM (A y B) y 1 nM (C y D) en acinos pancreáticos aislados de ratones normales (A y C) y ratones CF (B y D).

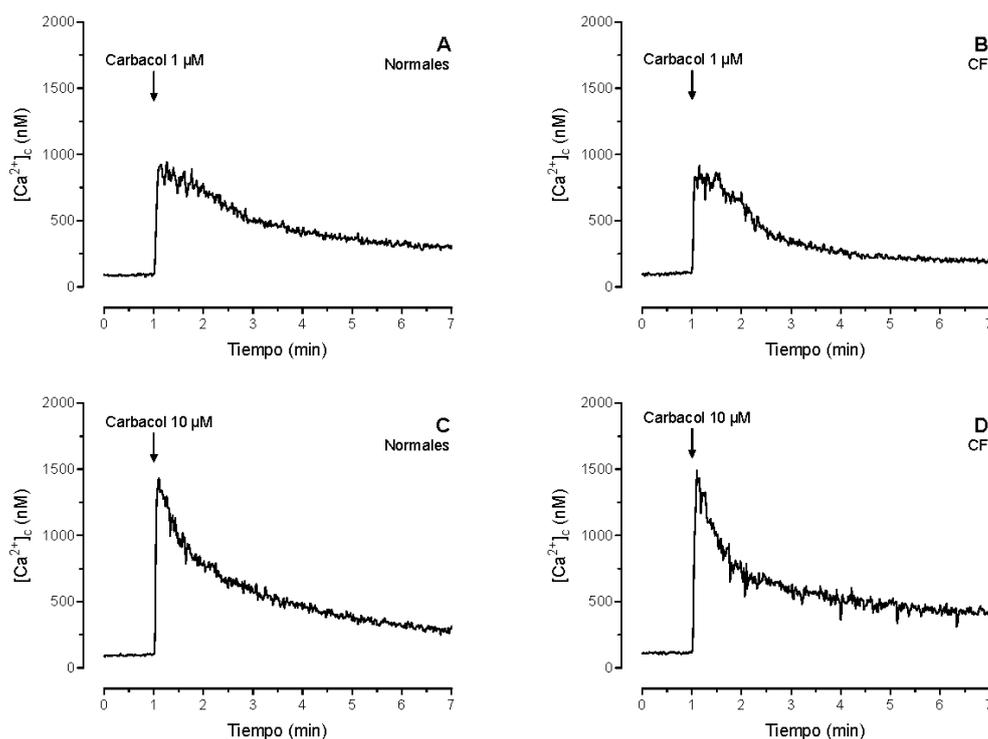


Figura 36. Concentración de calcio citosólico libre tras la estimulación con carbacol en acinos pancreáticos aislados de ratones normales y CF. Registros representativos de la concentración de calcio citosólico libre (nM) en respuesta a carbacol 1 μM (A y B) y 10 μM (C y D) en acinos pancreáticos aislados de ratones normales (A y C) y ratones CF (B y D).

Para el análisis de los datos, los valores de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ obtenidos en los experimentos se agruparon por periodos representativos (basal, estímulo y minuto 1 al 5 después del estímulo) (Figuras 37 y 38). Observamos que tanto los niveles de calcio citosólico libre basal como los obtenidos tras la estimulación con CCK-8 (a las concentraciones de 100 pM y 1 nM) son similares en los acinos de ratones normales y CF, y no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos en ninguno de los periodos analizados (Figura 37).

Obtuvimos resultados similares cuando se utilizó carbacol 10 μM como estímulo (Figura 38). Únicamente aparecieron diferencias significativas entre ratones normales y CF tras la administración de carbacol 1 μM , concretamente en el periodo posterior al estímulo (minutos 2 al 4). En este caso, los valores de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ fueron significativamente menores en los acinos procedentes de animales carentes de CFTR (Figura 38).

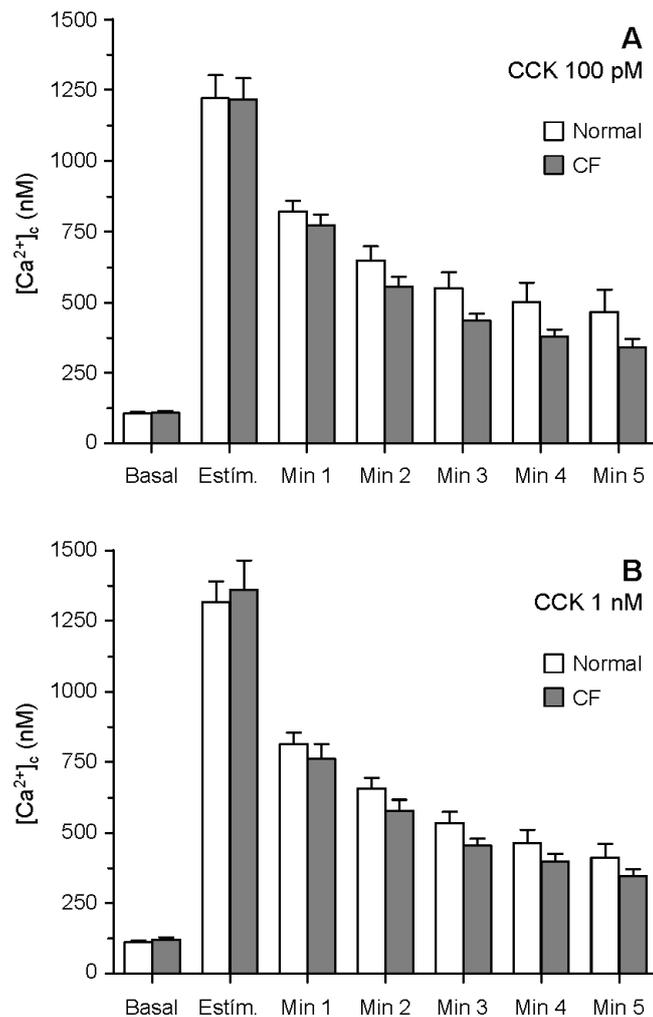


Figura 37. Concentración de calcio citosólico libre tras la estimulación con CCK-8 en acinos pancreáticos aislados de ratones normales y CF. Niveles de calcio citosólico libre (nM) en acinos de ratones normales (□) y CF (■) en situación basal y en respuesta a CCK-8 a las concentraciones de 100 pM (A, □ n=8; ■ n=7) y 1 nM (B, □ n=9; ■ n=7). Los valores son medias ± S.E.M. de los obtenidos en los diferentes periodos analizados: basal, estímulo y minutos 1-5.

Nuestros resultados demuestran que la $[Ca^{2+}]_c$ en los acinos pancreáticos de ratones CF es similar a la de ratones normales, tanto en situación basal como tras la estimulación con CCK-8 o carbacol. Sin embargo, como ya hemos descrito, sí que hemos encontrado una menor secreción de amilasas en los acinos de ratones CF tras la estimulación con estos secretagogos. La ausencia de alteraciones significativas en la señal de Ca^{2+} indica que la falta de CFTR no afecta a esta vía de señalización en las células acinares pancreáticas. No hemos encontrado en la bibliografía ningún estudio en el que se investigue la situación funcional de esta ruta intracelular en acinos de animales carentes de CFTR; en cualquier caso, nuestros resultados

indican claramente que las alteraciones en la secreción enzimática deben estar mediadas por algún acontecimiento posterior a la elevación de los niveles de Ca^{2+} citosólico tras la exposición al agonista.

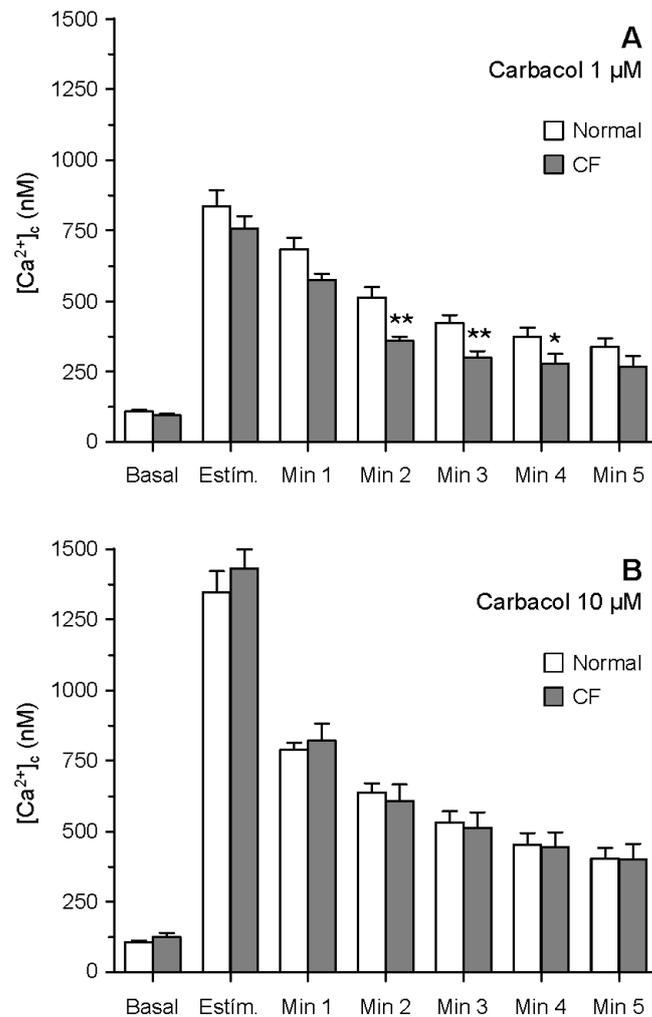


Figura 38. Concentración de calcio citosólico libre tras la estimulación con carbacol en acinos pancreáticos aislados de ratones normales y CF. Niveles de calcio citosólico libre (nM) en acinos de ratones normales (\square) y ratones CF (\blacksquare) en situación basal y en respuesta a carbacol, a las concentraciones de 1 μM (A, \square n=9; \blacksquare n=6) y 10 μM (B, \square n=9; \blacksquare n=7). Los valores son medias \pm S.E.M. de los obtenidos en los diferentes periodos analizados: basal, estímulo y minutos 1-5. Los resultados del test de la t de Student se muestran como * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ con respecto a los niveles de calcio citosólico libre en acinos de ratones normales.

3. ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICO DE LAS CORRIENTES ANIÓNICAS EN CÉLULAS DUCTULARES DE RATONES NORMALES Y CF

Estos estudios deben ser considerados como un intento preliminar de caracterizar los cambios inducidos por agonistas de la secreción en la conductancia aniónica de las células ductulares de ratones normales y CF, con el fin de avanzar en la caracterización de los mecanismos que hacen posible que, en conductos pancreáticos de ratones CF, se mantenga una secreción significativa de fluido y electrolitos a pesar de la falta de CFTR. Por definición, y teniendo en cuenta que la mayoría de la secreción de cationes tiene lugar por vía paracelular,⁴⁶ el mecanismo responsable de esta secreción residual en ausencia de CFTR debe ser electrogénico, pues, de no ser así, no podría mantener una secreción neta hacia el lumen ductular. Los resultados previos de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que la secreción que se mantiene en conductos pancreáticos de ratones CF no depende, obviamente, de la acción de CFTR, ausente en estos animales, pero tampoco de la activación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} .²⁵⁶ Así pues, debemos pensar en la participación de un transportador de membrana diferente a estos, cuya actividad, al tratarse de un mecanismo electrogénico, se podría detectar por técnicas electrofisiológicas.

En las células ductulares pancreáticas se ha descrito la existencia de al menos tres tipos de canales aniónicos diferentes. En primer lugar, utilizando la configuración de canal aislado de la técnica de *patch-clamp*, se descubrió que, en la rata, estas células expresan un canal de baja conductancia, que se activa por efecto de la secretina, y que fue identificado como el CFTR.¹¹⁰ La expresión de este canal aniónico en la membrana apical de las células de los conductos pancreáticos se ha demostrado en todas aquellas especies en las que se ha investigado.³²⁸ En segundo lugar, se identificó, utilizando células procedentes de ratones CF, la presencia de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} (CACC), que también se han localizado en la membrana apical.¹¹⁵ Por último, en 1995 Verdon *et al.*³⁶¹ describieron la presencia, en células ductulares del páncreas de la rata, de canales de Cl^- dependientes de volumen (VACC), que hasta la fecha no se han localizado en ninguna porción concreta de la membrana, y cuyo papel fisiológico, en un epitelio encargado de la secreción de un fluido isotónico, resulta enigmático.

En nuestros experimentos hemos utilizado un total de 25 células ductulares pancreáticas procedentes de ratones normales y 20 de ratones CF. El reducido tamaño de muestra, junto al hecho de que en un porcentaje importante de estas células (superior al 50%) no hubiese ningún tipo de cambio eléctrico tras la exposición a los agonistas, son la causa de que estos resultados se muestren como registros representativos de corrientes iónicas en células individuales y de que no se haya realizado análisis estadístico de los resultados obtenidos. La observación de que muchas de estas células no respondiesen a la estimulación con los agonistas confirma los resultados descritos por Gray *et al.*,¹¹⁴ quienes encontraron que un 41% de las células ductulares de la rata no mostraban ningún tipo de respuesta electrofisiológica a la elevación del cAMP.

El tamaño de las células, medido automáticamente por el amplificador de *patch-clamp*, fue de 5.63 ± 0.35 pF en el grupo normal y de 6.20 ± 0.45 pF en el grupo CF; las diferencias entre estos valores no resultaron estadísticamente significativas.

3.1. Corrientes aniónicas estimuladas por forskolina + IBMX o por carbacol en células de ratones normales

La perfusión de células procedentes de ratones normales con forskolina $10 \mu\text{M}$ + IBMX $200 \mu\text{M}$ provocó, en algunas de ellas, la activación de una conductancia aniónica (Figura 39B), a partir de una situación basal en la que apenas había corrientes eléctricas en respuesta a los pulsos de voltaje (Figura 39A). El perfil de las corrientes activadas en estas condiciones no mostró ningún fenómeno de activación o inactivación, ni a potenciales despolarizantes ni hiperpolarizantes (Figura 39B). La relación I/V para estas corrientes (Figura 39C) mostró un potencial de reversión muy cercano al valor predicho por la ecuación de Nernst para el potencial de equilibrio del Cl^- en nuestras condiciones experimentales (-45.92 mV), lo que indica que estas corrientes están provocadas por el flujo de este anión a través de la membrana. Por otra parte, la relación I/V mostró una ligera rectificación hacia fuera en los potenciales más despolarizantes. Todas estas características de la conductancia permiten adscribirla a la activación de los canales CFTR.¹¹⁴

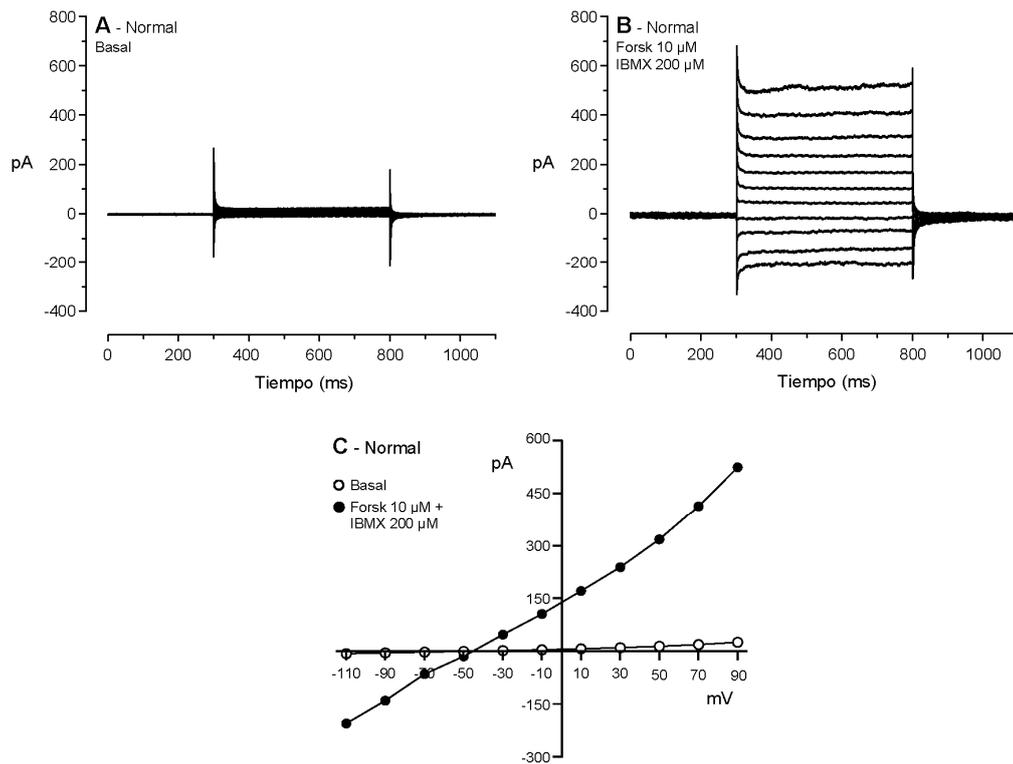


Figura 39. Efecto de la forskolina e IBMX sobre las corrientes de Cl^- en una célula ductular pancreática de un ratón normal. Perfil de las corrientes de Cl^- en una célula ductular: (A) en situación basal, y (B) tras la estimulación con forskolina 10 μM + IBMX 200 μM . (C) Relación I/V de las corrientes mostradas en A y B. La célula se mantuvo a un potencial de -45 mV y recibió 11 pulsos de voltaje, de 500 ms de duración, desde -110 mV hasta 90 mV, a intervalos de 20 mV. Los datos de corriente eléctrica representados en C se obtuvieron como la media de los valores, para cada pulso de voltaje, en los últimos 150 ms del mismo, que se corresponden con el periodo 650-800 ms en el eje de ordenadas de A (○) y B (●).

En células de ratones normales estimuladas con carbacol 30 μM pudimos observar también la activación de corrientes aniónicas (Figura 40). En este caso, el perfil de las corrientes fue completamente diferente, pues mostró una fuerte activación a potenciales despolarizantes (Figura 40B). Además, esta conductancia se inhibió casi por completo tras la adición de H_2DIDS 500 μM al medio de perfusión (Figura 40C). La relación I/V (Figura 40D) mostró una fuerte rectificación hacia fuera, con un potencial de reversión del orden de -45 mV, indicando, también en este caso, una selectividad casi absoluta para el Cl^- . Las características de esta conductancia aniónica son compatibles con la activación de los canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} (CACC),^{83,88} como consecuencia de la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la estimulación con carbacol.^{256149,256}

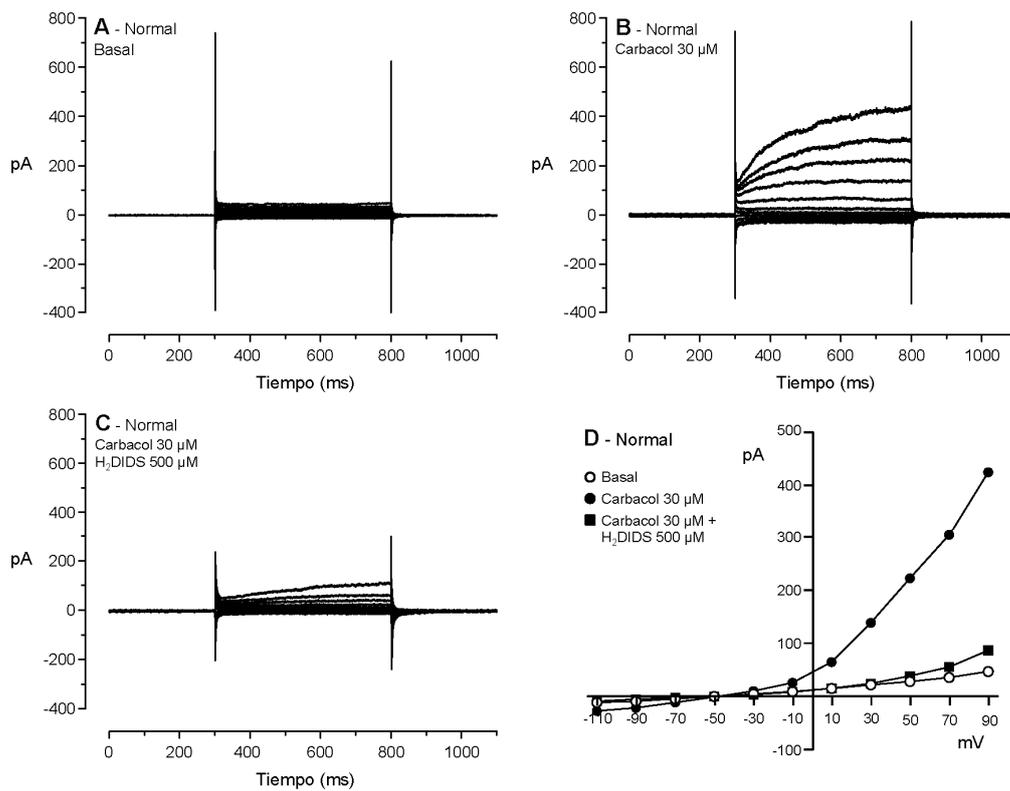


Figura 40. Efecto del carbacol sobre las corrientes de Cl⁻ en una célula ductular pancreática de un ratón normal. Perfil de las corrientes de Cl⁻ en una célula ductular: (A) en situación basal, (B) tras la estimulación con carbacol 30 μM, y (C) tras la estimulación con carbacol 30 μM en presencia de H₂DIDS 500 μM. (D) Relación I/V de las corrientes mostradas en A, B y C. La célula se mantuvo a un potencial de -45 mV y recibió 11 pulsos de voltaje, de 500 ms de duración, desde -110 mV hasta 90 mV, a intervalos de 20 mV. Los datos de corriente eléctrica representados en D se obtuvieron como la media de los valores, para cada pulso de voltaje, en los últimos 150 ms del mismo, que se corresponden con el periodo 650-800 ms en el eje de ordenadas de A (○), B (●) y C (■).

La activación del CFTR como consecuencia de su fosforilación por la PKA se conoce desde hace mucho tiempo²⁵ y, de hecho, se considera que es el fenómeno clave para la puesta en marcha de los procesos secretores en las células ductulares pancreáticas.³²⁸ Por su parte, los CACC parecen estar implicados en la respuesta secretora a agonistas que elevan la concentración de Ca²⁺ citosólico, cumpliendo en este caso un papel similar al del CFTR, es decir, incrementando la conductancia al Cl⁻ de la membrana luminal y activando así todo el proceso secretor.³²⁸

3.2. Corrientes aniónicas estimuladas por forskolina + IBMX o por carbacol en células de ratones CF

La estimulación de las células ductulares pancreáticas procedentes de ratones CF con carbacol 30 μM indujo, en algunas de ellas, la activación de corrientes aniónicas con características idénticas a las descritas en células de ratones normales (Figura 41). También en este caso se puede observar una fuerte activación a potenciales despolarizantes (Figura 41B), sensibilidad a H_2DIDS (Figura 41C), y una relación I/V (Figura 41D) con fuerte rectificación hacia fuera y con un potencial de reversión cercano a -45 mV. Todo ello, de nuevo, indica que el carbacol ha provocado la activación de los CACC en estas células.

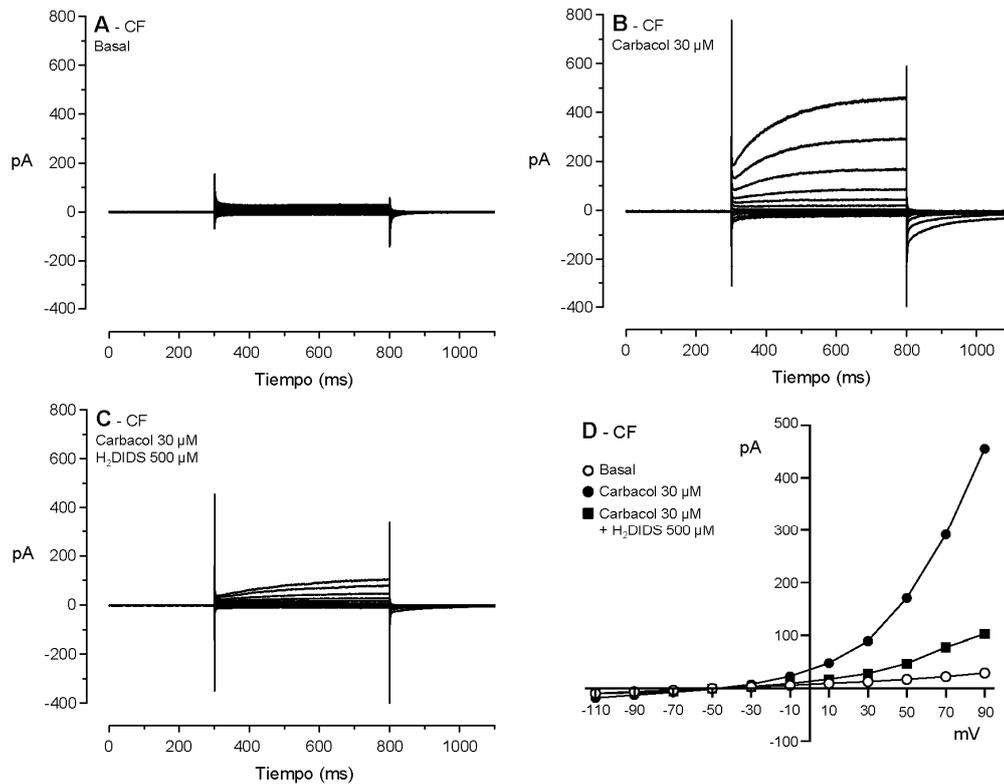


Figura 41. Efecto del carbacol sobre las corrientes de Cl^- en una célula ductular pancreática de un ratón CF. Perfil de las corrientes de Cl^- en una célula ductular: (A) en situación basal, (B) tras la estimulación con carbacol 30 μM , y (C) tras la estimulación con carbacol 30 μM en presencia de H_2DIDS 500 μM . (D) Relación I/V de las corrientes mostradas en A, B y C. La célula se mantuvo a un potencial de -45 mV y recibió 11 pulsos de voltaje, de 500 ms de duración, desde -110 mV hasta 90 mV, a intervalos de 20 mV. Los datos de corriente eléctrica representados en D se obtuvieron como la media de los valores, para cada pulso de voltaje, en los últimos 150 ms del mismo, que se corresponden con el periodo 650–800 ms en el eje de ordenadas de A (\circ), B (\bullet) y C (\blacksquare).

Como ya hemos mencionado, la expresión de los CACC en los conductos pancreáticos se describió por primera vez precisamente en células procedentes de ratones CF.¹¹⁵ De hecho, y como ya se ha revisado en un apartado anterior de este trabajo, durante algún tiempo se pensó que la actividad de estos canales, en las células ductulares de esta especie, podría explicar la falta de alteraciones en el páncreas de los animales CF,³⁸⁷ aunque esta idea está ya prácticamente abandonada.^{256,375} En todo caso, estos canales están presentes en la membrana luminal de las células ductulares pancreáticas del ratón y de otras especies,^{9,117} incluyendo a la humana,³⁷⁶ y participan activamente en los procesos secretorios estimulados por agonistas que utilizan la vía del Ca^{2+} .

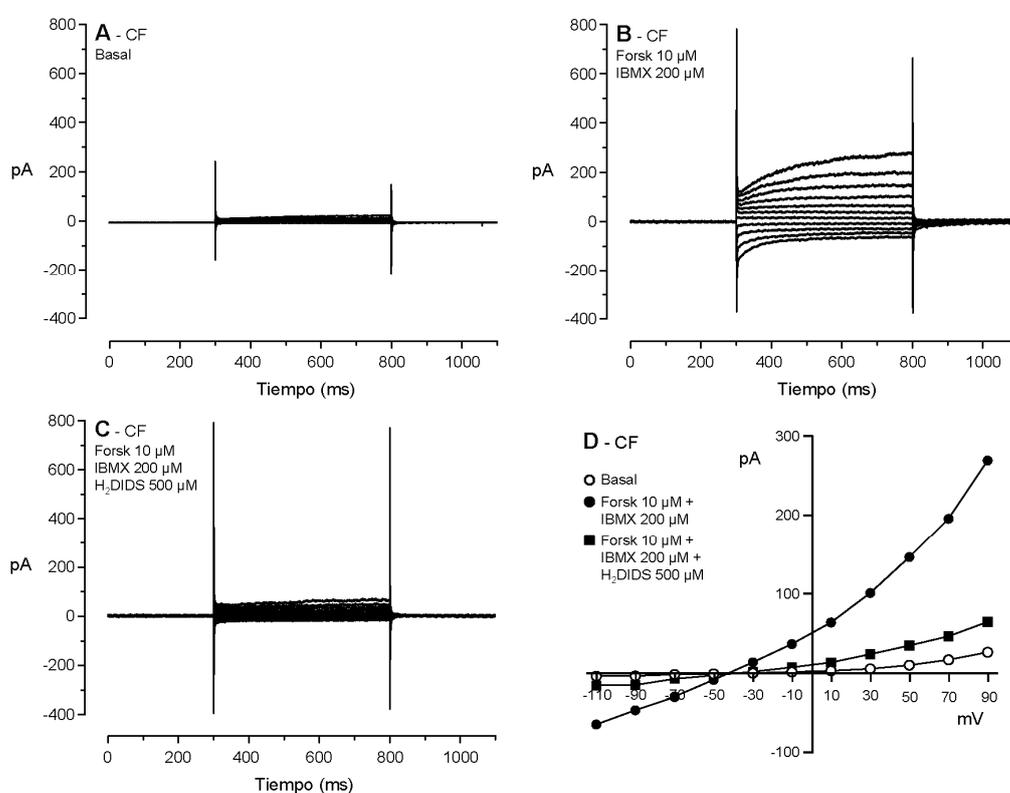


Figura 42. Efecto de la forskolina e IBMX sobre las corrientes de Cl^- en una célula ductular pancreática de un ratón CF. Perfil de las corrientes de Cl^- en una célula ductular: (A) en situación basal, (B) tras la estimulación con forskolina 10 μM + IBMX 200 μM y (C) tras la estimulación con forskolina 10 μM + IBMX 200 μM en presencia de H_2DIDS 500 μM . (D) Relación I/V de las corrientes mostradas en A, B y C. La célula se mantuvo a un potencial de -45 mV y recibió 11 pulsos de voltaje, de 500 ms de duración, desde -110 mV hasta 90 mV, a intervalos de 20 mV. Los datos de corriente eléctrica representados en D se obtuvieron como la media de los valores, para cada pulso de voltaje, en los últimos 150 ms del mismo, que se corresponden con el periodo 650-800 ms en el eje de ordenadas de A (○), B (●) y C (■).

La mayoría de las células de ratones CF que fueron perfundidas con forskolina $10\ \mu\text{M}$ + IBMX $200\ \mu\text{M}$ no mostró ningún tipo de respuesta desde el punto de vista de la activación de canales aniónicos, manteniéndose el perfil de las corrientes muy similar al obtenido en situación basal a pesar de la presencia del estímulo. Obviamente, no observamos corrientes compatibles con la activación de CFTR en ninguna de estas células, en las que esta proteína no está presente, ni siquiera de forma residual.²⁶⁹ En dos de las células, sin embargo, sí que pudimos observar la activación de corrientes aniónicas tras la estimulación con estas sustancias. Los resultados obtenidos en una de ellas se muestran en la Figura 42, en la que se puede observar que, a partir de la situación basal (Figura 42A), se activan corrientes aniónicas, con un perfil diferente al de CFTR y al de CACC (Figura 42B): en este caso se puede apreciar la presencia de fenómenos de inactivación moderada de las corrientes a potenciales hiperpolarizantes, mientras que hay activación, también moderada, a potenciales despolarizantes. En esta célula se comprobó también la sensibilidad de esta conductancia aniónica al H_2DIDS $500\ \mu\text{M}$, que funcionó como un potente bloqueante de las corrientes activadas en presencia de forskolina e IBMX (Figura 42C). La relación I/V muestra una clara rectificación hacia fuera, pero no tan intensa como la observada al activar los CACC, y una selectividad para el Cl^- muy elevada, pues el potencial de reversión es del orden de $-45\ \text{mV}$ (Figura 42D).

Puesto que algunas de las características de esta conductancia aniónica son relativamente similares a las de los CACC, y con el fin de resaltar sus diferencias, hemos analizado la relación I/V, normalizada según el tamaño de las células correspondientes (densidad de la corriente, $\text{pA}\cdot\text{pF}^{-1}$), calculada a partir de los valores de corriente seleccionados inmediatamente después de iniciarse cada pulso de voltaje, obtenidos de los registros mostrados en las Figuras 41B (CACC) y 42B (conductancia desconocida) (Figura 43). En esta gráfica se puede apreciar que, al iniciar los pulsos de voltaje, antes de desarrollarse por completo los fenómenos de activación o inactivación que caracterizan al perfil de estas corrientes, la relación I/V de los CACC muestra ya una fuerte rectificación hacia fuera, mientras que la relación I/V de la conductancia desconocida es casi lineal, con solo una muy ligera rectificación. Las mayores diferencias entre ambas conductancias se pueden apreciar a potenciales hiperpolarizantes (salida de Cl^- de la célula), en los que la densidad de la corriente activada es netamente mayor, en términos absolutos, en la conductancia desconocida que en los CACC.

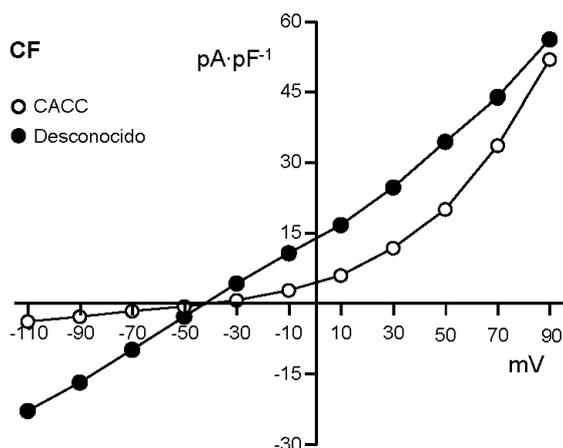


Figura 43. Relación I/V tras la estimulación con carbacol 30 μM o con forskolina 10 μM + IBMX 200 μM en células ductulares pancreáticas de ratones CF. Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en las figuras 41B y 42B. La densidad de la corriente ($\text{pA}\cdot\text{pF}^{-1}$) se obtuvo calculando las medias de las corrientes de Cl^- en el periodo 50–200 ms de cada pulso de voltaje (350–500 ms en el eje de ordenadas de las figuras 41B y 42B) y normalizándolas con respecto al tamaño de cada célula, 6.7 pF en 41B (○, "CACC") y 3.6 pF en 42B (●, "Desconocido").

Las características biofísicas de las corrientes activadas por la elevación del cAMP, en algunas de las células ductulares procedentes de ratones CF, no se corresponden con ninguno de los tipos de canales aniónicos descritos hasta el momento en este tipo celular. Los canales de Cl^- dependientes de volumen (VACC) muestran rectificación hacia fuera y se pueden bloquear con H_2DIDS pero, en contraste con la activación a potenciales despolarizantes que hemos observado en nuestros experimentos, los VACC se caracterizan por presentar inactivación de las corrientes a estos valores de potencial de membrana;³⁶¹ por otra parte, como ya hemos mencionado, la eventual contribución de los VACC a los procesos secretores es más que dudosa.

Nuestra principal hipótesis para explicar el mecanismo por el que las células ductulares del ratón pueden mantener una secreción significativa en respuesta a la forskolina es la intervención del intercambiador aniónico electrogénico luminal, el SLC26A6.²⁵⁶ La estequiometría $2\text{HCO}_3^-:1\text{Cl}^-$ de este transportador implica la secreción neta de un anión hacia el lumen ductular; además, dado que la especificidad del SLC26A6 para los aniones es baja, este transportador podría funcionar, en ausencia de HCO_3^- , como un intercambiador $2\text{Cl}^-/1\text{Cl}^-$, lo que también podría explicar la secreción de Cl^- que se mantiene en los conductos de ratones CF.²⁵⁶ Aunque es un tema bastante controvertido,⁸⁰ se ha descrito que el SLC26A6 humano y

el de ratón difieren en su estequiometría, de manera que el humano funcionaría como un intercambiador electroneutro.⁶² Esto podría explicar la diferente gravedad de las manifestaciones de la fibrosis quística en el páncreas humano y el de ratón. Alternativamente, si el SLC26A6 humano es también electrogénico, como defienden algunos autores,⁸⁰ podríamos estar en presencia de algún fenómeno adaptativo, ante la falta de CFTR, que implicase una mayor expresión de este intercambiador en el ratón, fenómeno que no se manifestaría en la especie humana.

La electrogenicidad de este intercambiador aniónico hace posible la detección de su actividad por métodos electrofisiológicos. En nuestras condiciones experimentales, en ausencia de HCO_3^- en el medio de perfusión, el SLC26A6 estaría funcionando como un intercambiador $2\text{Cl}^-/1\text{Cl}^-$, es decir, mediando la salida neta de un ion Cl^- a través de la membrana luminal. Un dato que permite apoyar la hipótesis de que las corrientes aniónicas que hemos detectado están mediadas por la actividad del SLC26A6 es que este transportador es sensible a H_2DIDS ,³²⁹ y hemos podido comprobar que este bloqueante reduce de forma muy marcada las corrientes aniónicas activadas por la elevación del cAMP en las células de ratones CF. Sin embargo, la sensibilidad al H_2DIDS no es una prueba definitiva, ya que esta sustancia es capaz de afectar a la función de muchos otros transportadores y canales aniónicos, incluyendo al menos al pNBC1,¹⁵⁴ los AE,²⁰⁵ los CACC,¹⁴⁴ y los VACC.³⁶¹

No hemos encontrado en la bibliografía ningún trabajo en el que se analicen, por técnicas de *patch-clamp*, las corrientes mediadas por SLC26A6 en tejidos nativos. En 2002, Ko *et al.*¹⁸⁶ midieron las corrientes eléctricas mediadas por SLC26A6 expresado en oocitos de *Xenopus*, usando técnicas de *voltage-clamp*. Sus resultados muestran un perfil de las corrientes caracterizado por una ligera inactivación, tanto a potenciales despolarizantes como hiperpolarizantes, mientras que la relación I/V no mostró fenómenos de rectificación apreciables. Salvando las diferencias entre ambas técnicas experimentales, algunas de las características de estas corrientes son similares a las observadas en nuestros experimentos, muy especialmente cuando sometemos a las células a un pulso de voltaje hiperpolarizante.

Si las corrientes activadas por la forskolina y el IBMX en las células ductulares de ratones CF estuviesen mediadas por SLC26A6, tendríamos todavía que explicar la activación de este cotransportador tras la elevación del cAMP; como ya hemos mencionado, parece admitido que

el SLC26A6 puede activarse por esta vía de señalización, aunque este efecto es, en todo caso, secundario a la fosforilación y activación del CFTR.¹⁸⁸ No disponemos de ninguna información acerca de cómo puede producirse la activación de este intercambiador aniónico por el cAMP en ausencia de CFTR.

Lamentablemente, llegados a este punto, la falta de financiación para esta línea de investigación hizo que nos resultase inevitable interrumpirla, lo que implicó la eliminación de la colonia de ratones *Cftr*^{tm1Cam} de nuestras instalaciones.

4. FUNCIONALIDAD DE LOS CONDUCTOS PANCREÁTICOS DE RATA EN LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL

4.1. Control histológico de la gravedad de la pancreatitis aguda

4.1.1. Cambios histológicos durante la pancreatitis aguda inducida por taurocolato

Las alteraciones histológicas producidas como consecuencia de la pancreatitis aguda fueron analizadas en páncreas de ratas tras la infusión retrógrada, a través del conducto pancreático, de taurocolato sódico (grupo pancreatitis) o solución salina (grupo control).

En la Figura 44 se muestran cuatro imágenes (A-D) de secciones de páncreas, teñidas con hematoxilina-eosina, de una rata con pancreatitis aguda (C y D) y de su correspondiente control (A y B).

La morfología del páncreas de rata control (Figura 44A) es la típica de la glándula y presenta un tejido homogéneo. Los acinos muestran una estructura normal, con células que conservan su polaridad y sus límites intactos. Los conductos pancreáticos de estos animales (Figura 44B) tampoco presentan anomalías, observándose con claridad su pared, un epitelio cúbico monoestratificado, rodeado de tejido conjuntivo, con una morfología organizada.

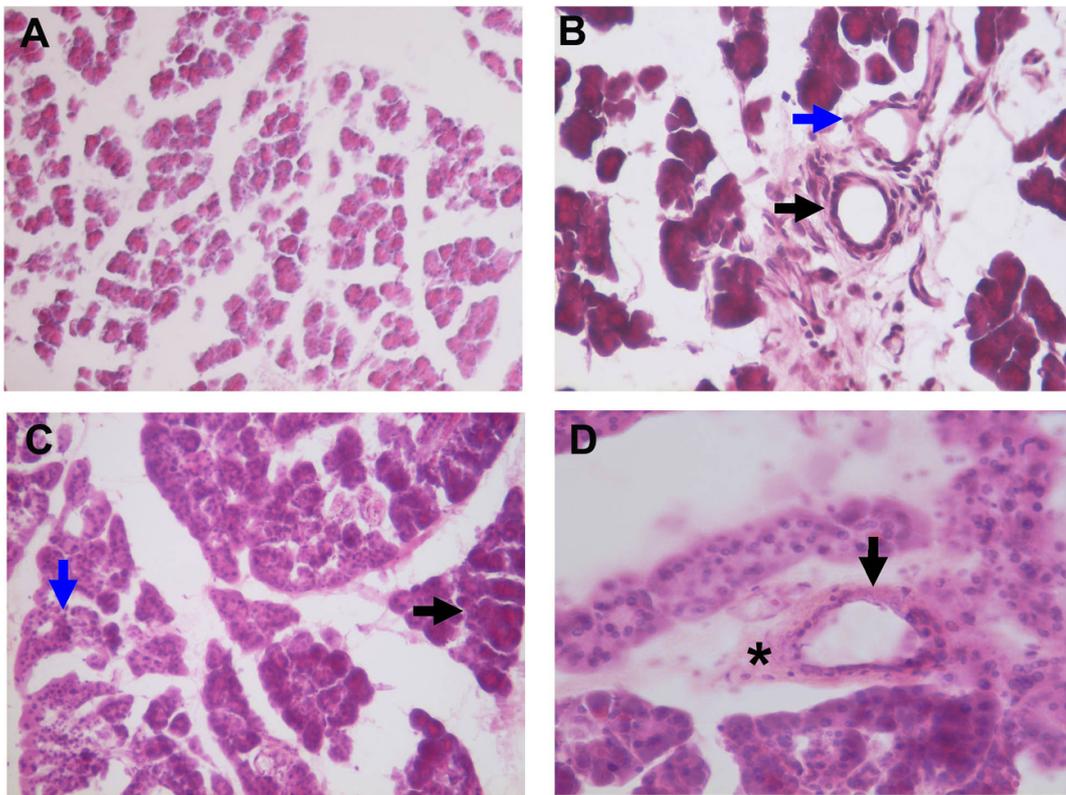


Figura 44. Alteraciones histológicas del páncreas en el modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por taurocolato sódico. Secciones de páncreas, obtenidas de ratas a las que se les infundió solución salina (A y B) o taurocolato sódico (C y D) a través del conducto pancreático, teñidas con el método de hematoxilina-eosina. **Imagen A** (x100): acinos pancreáticos de rata control. **Imagen B** (x200): conducto pancreático de rata control (flecha negra) junto a un vaso sanguíneo (flecha azul). **Imagen C** (x100): acinos pancreáticos de rata del grupo pancreatitis. Se observa una zona donde los acinos mantienen su morfología normal (flecha negra) y otra zona donde existe una desorganización importante del tejido acinar (flecha azul). **Imagen D** (x200): Conducto pancreático de rata del grupo pancreatitis (flecha negra) rodeado de fibras de colágeno (*).

La infusión de taurocolato a través del conducto pancreático de la rata produce alteraciones histológicas importantes (Figura 44, C y D), más evidentes en determinadas zonas del páncreas. En la imagen 44 C se observa una región de la glándula en la que los acinos conservan una morfología normal, similar a la de los animales controles; sin embargo, en otra zona aparecen alteraciones importantes en la estructura y organización de los acinos, que pierden su polaridad y sus límites celulares. Los conductos únicamente aparecen en las zonas del páncreas que presentan una estructura menos alterada. En estos conductos se observa una desorganización celular del epitelio y una acumulación de tejido conjuntivo, formado posiblemente por fibras de colágeno, alrededor de ellos (Figura 44D).

Los cambios histológicos que hemos observado en las ratas sometidas a la infusión retrógrada de taurocolato sódico en el conducto biliopancreático son similares a los descritos por nuestro grupo de investigación¹⁴⁰ y por otros autores,^{52,194} y confirman el establecimiento de una pancreatitis aguda necrohemorrágica en estos animales.

4.1.2. Cambios histológicos durante la pancreatitis aguda inducida por ceruleína y L-arginina

Las alteraciones histológicas del páncreas se analizaron también en ratas a las que se indujo pancreatitis aguda mediante hiperestimulación con ceruleína o por la administración de L-arginina, y en sus correspondientes controles. Los páncreas de los animales controles de estos grupos no presentan ninguna alteración histológica significativa, ya que, como cabía esperar, la inyección subcutánea o intraperitoneal de un pequeño volumen de NaCl 150 mM no provoca ningún daño estructural en la glándula. Las imágenes A y B de la Figura 45 corresponden a secciones obtenidas de un animal del grupo control de pancreatitis inducida por ceruleína, y son representativas de la situación normal del páncreas. En la imagen A se observa que la glándula de estos animales presenta una morfología y organización acinar típica, mientras que en la imagen B se puede apreciar un conducto pancreático, también con apariencia normal, junto a vasos sanguíneos y rodeado de acinos.

La ceruleína produce una pancreatitis aguda edematosa en la rata y, a nivel histológico, provoca alteraciones en la glándula. Se observa una infiltración moderada de leucocitos en el parénquima pancreático y la morfología de algunos acinos aparece alterada, aunque la mayoría de ellos no presentan diferencias con respecto al control (Figura 45C). Con respecto a los conductos pancreáticos, su morfología es normal, con un epitelio bien definido y organizado (Figura 45D).

Los cambios histológicos que hemos observado en las ratas que fueron sometidas al tratamiento con ceruleína coinciden con los descritos por diversos autores en este modelo de pancreatitis aguda experimental.^{68,251}

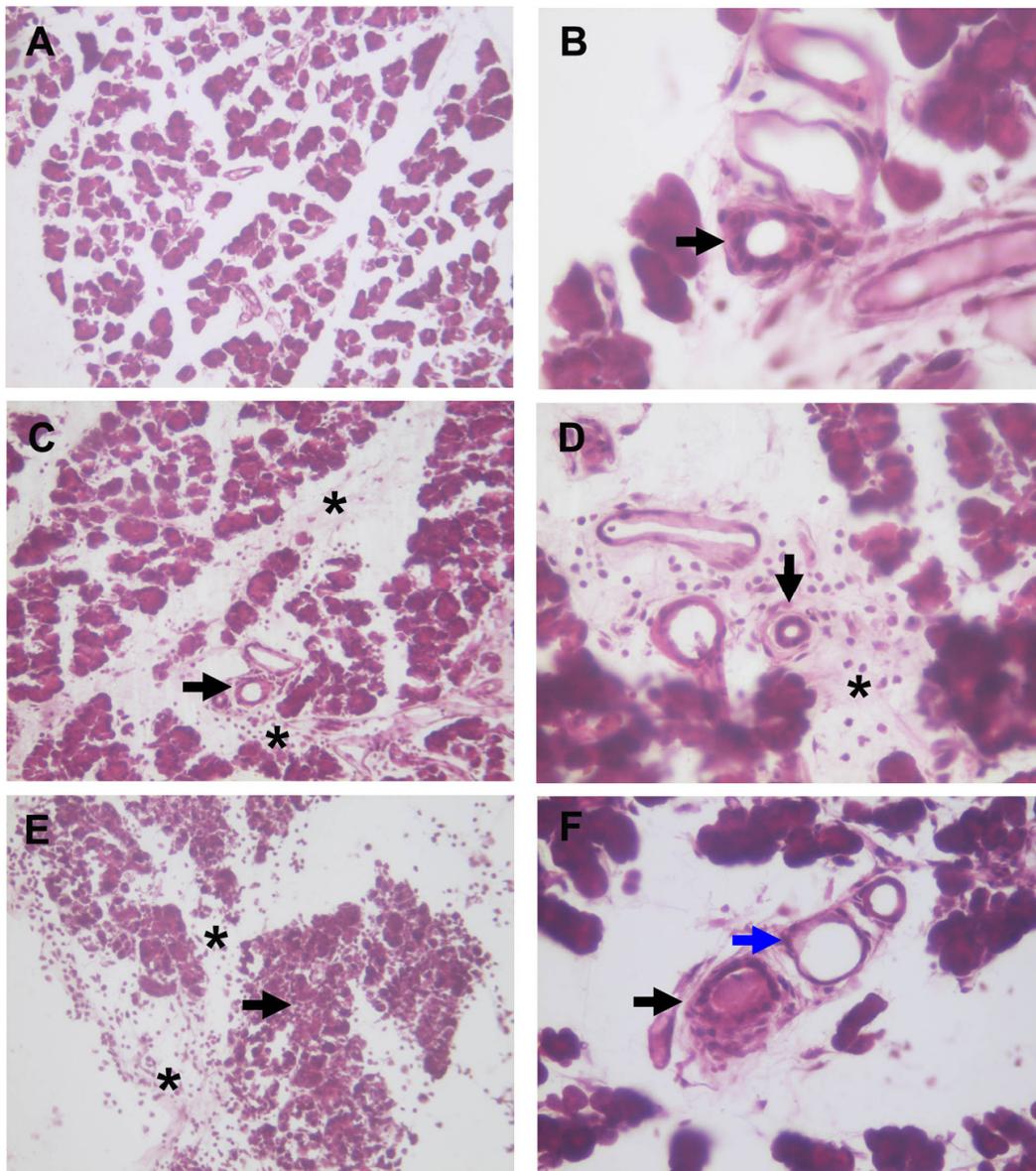


Figura 45. Alteraciones histológicas del páncreas en los modelos experimentales de pancreatitis aguda inducida por hiperestimulación con ceruleína y por administración de L-arginina. Secciones de páncreas teñidas con el método de hematoxilina eosina, obtenidas de ratas controles (A y B), con pancreatitis aguda inducida con ceruleína (C y D) y con pancreatitis aguda inducida con L-arginina (E y F). **Imagen A** (x100): acinos pancreáticos de rata control. **Imagen B** (x200): conducto pancreático de rata control (flecha negra). **Imagen C** (x100): acinos pancreáticos de rata del grupo pancreatitis inducida por ceruleína. Se observa una zona del parénquima con una infiltración moderada de leucocitos (*) y un conducto pancreático (flecha negra) junto a vasos sanguíneos. **Imagen D** (x200). Conducto pancreático (flecha negra) de rata del grupo pancreatitis inducida por ceruleína en una zona donde se observa infiltración de leucocitos (*). **Imagen E** (x100): acinos pancreáticos de rata del grupo pancreatitis inducida por L-arginina. Se observa infiltración masiva de leucocitos en el parénquima (*) y una gran desorganización de los acinos (flecha negra). **Imagen F** (x200). Conducto pancreático de rata del grupo pancreatitis inducida por L-arginina (flecha negra) junto a vasos sanguíneos (flecha azul). Se observa acumulación de una materia eosinófila en el lumen ductular.

Las imágenes E y F de la Figura 45 corresponden a una rata con pancreatitis aguda inducida por L-arginina, en la que se observa un mayor daño tisular que en el grupo ceruleína (imágenes C y D). Tras la administración de L-arginina se produce una pérdida de la integridad acinar y se forman grandes huecos entre los acinos; además, encontramos una infiltración masiva de leucocitos en el parénquima pancreático (Figura 45E). En estos animales los conductos aparecen rodeados de fibras de colágeno y, a menudo, su lumen está lleno de una materia eosinófila (Figura 45F).

Otros autores, utilizando dosis y pautas de administración equivalentes de L-arginina, han descrito alteraciones histológicas similares a las observadas en nuestro estudio, en lo que respecta al daño en las células acinares y a la respuesta inflamatoria en la glándula.^{135,181} Sin embargo, no hemos encontrado ningún trabajo en el que se describan alteraciones en los conductos pancreáticos semejantes a las que hemos observado en nuestros animales; Kishino *et al.*¹⁸¹ describieron la presencia de algunos conductos pancreáticos con el lumen dilatado, 72 horas después de la inducción de la pancreatitis, pero no observaron ningún cambio apreciable en la estructura del árbol ductal a las 24 horas de la inducción, tiempo equivalente al usado en nuestro trabajo. La presencia en este modelo experimental de material precipitado en el interior de los conductos no se ha descrito, que sepamos, hasta el momento; pensamos que estos acúmulos pueden estar formados por agregados de proteínas procedentes de la secreción acinar, de forma similar a lo que se ha descrito en otras patologías.²⁹²

4.2. Efectos de la pancreatitis aguda inducida por infusión retrógrada de taurocolato sódico en la respuesta secretora de los conductos pancreáticos de rata

Con el fin de analizar si la función ductular pancreática está alterada durante la pancreatitis aguda, hemos analizado la respuesta secretora de los conductos pancreáticos aislados de ratas a las que se indujo pancreatitis aguda mediante la infusión retrógrada de taurocolato sódico a través del conducto pancreático (grupo pancreatitis), y hemos comparado esta respuesta con la de conductos pancreáticos aislados de animales a los que se les infundió solución salina en las mismas condiciones (grupo control).

Nuestros resultados muestran que la forskolina, en tampón HEPES o en tampón HCO_3^- , produce un incremento en el volumen luminal relativo de los conductos, tanto del grupo pancreatitis como del grupo control (Figura 46), y que esta respuesta es similar en los dos grupos. Además, se observa que, cuando se cambia el medio de perfusión de HEPES a HCO_3^- , en el minuto 25 del experimento, se produce un incremento en la pendiente del volumen luminal relativo en respuesta a forskolina. Este cambio se produce tanto en los conductos aislados de ratas control como en los procedentes de animales con pancreatitis.

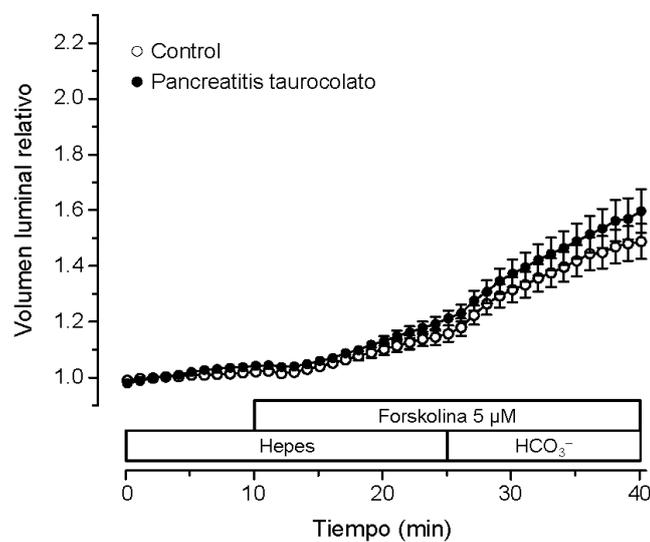


Figura 46. Secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por infusión retrógrada de taurocolato sódico a través del conducto pancreático. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos de ratas del grupo control (\circ , $n=38$) y del grupo pancreatitis (\bullet , $n=45$), estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ en solución HEPES y en solución HCO_3^- . Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

Los resultados de las tasas secretoras (Figura 47) confirman los obtenidos en el volumen luminal relativo. La forskolina estimula la tasa de secreción, tanto durante la perfusión con HEPES como durante la perfusión con HCO_3^- , en los conductos de ambos grupos de animales. El análisis estadístico de los resultados muestra que no existen diferencias significativas entre las tasas secretoras alcanzadas por conductos de rata control y con pancreatitis en respuesta a forskolina a lo largo del experimento.

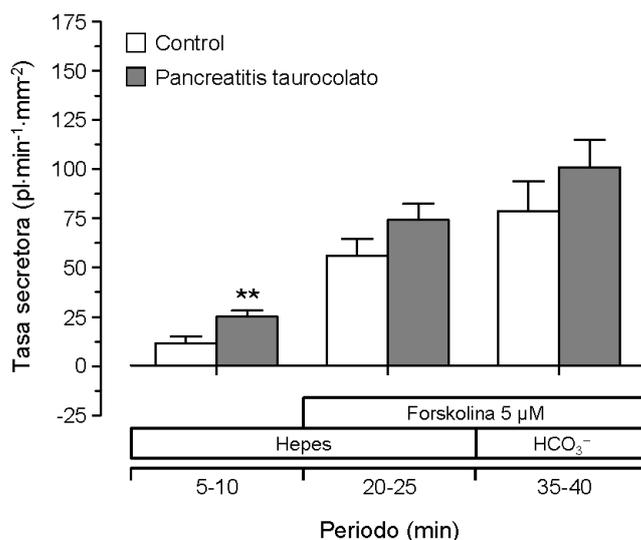


Figura 47. Secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por infusión retrógrada de taurocolato sódico a través del conducto pancreático. Tasa secretora en conductos de ratas del grupo control (□; n=38) y del grupo pancreatitis (■; n=45), estimulados con forskolina 5 μ M en solución HEPES y en solución HCO₃⁻. Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 46 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como ** $P < 0.01$ con respecto a los conductos de animales controles.

El modelo de inducción de pancreatitis aguda por infusión retrógrada de sales biliares en el conducto pancreático de la rata da lugar a una patología grave, asociada a una elevada mortalidad en estos animales.¹⁰² Este modelo se caracteriza, además, por producir manifestaciones patológicas muy heterogéneas en diferentes porciones de la glándula pancreática. Así, en las secciones histológicas procedentes de animales con pancreatitis, encontramos zonas con una morfología prácticamente normal junto a otras en las que el grado de desorganización del tejido es muy importante (Figura 44). Nuestros resultados demuestran que la secreción ductular no está alterada en este modelo de pancreatitis; al extraer el páncreas de estos animales, encontramos zonas completamente necrosadas, sobre todo en las cercanías de la desembocadura del conducto biliopancreático, que tuvieron que ser descartadas en el procedimiento de obtención de conductos pancreáticos. De este modo, los conductos aislados de estos animales procedían de las zonas del páncreas que mantenían una cierta integridad a pesar de la infusión retrógrada de taurocolato.

Por otro lado, como hemos revisado en el apartado de *Introducción*, parece demostrado que el taurocolato infundido en el conducto biliopancreático puede permanecer varias horas en el páncreas, pudiendo llegar a alcanzar los conductos más periféricos.⁵ Cálculos teóricos han permitido postular que, durante la pancreatitis por litiasis biliar, la concentración de sales biliares en los conductos pancreáticos más proximales, en las cercanías de las células acinares, puede llegar a ser del orden de 50-100 μM ;³⁵⁹ esta concentración, tras la infusión retrógrada de taurocolato, debería ser incluso mayor.

Recientemente, Venglovecz *et al.*³⁵⁹ han descrito que el quenodesoxicolato sódico, a la concentración de 100 μM , provoca una hipersecreción de fluido en conductos pancreáticos aislados de cobaya, mientras que una concentración mayor (1 mM) inhibe de forma muy marcada la secreción ductular. Si asumimos que, tras la infusión retrógrada de taurocolato, esta sal biliar llega a los conductos interlobulares (los utilizados en este trabajo), estos efectos, de manifestarse, serían transitorios y no tendrían ninguna consecuencia funcional a largo plazo, tras el aislamiento y cultivo primario de los conductos. Esta afirmación deriva del hecho de que no hemos encontrado ningún tipo de diferencia entre la respuesta secretora de los conductos pancreáticos de ratas con pancreatitis aguda inducida por taurocolato y la de sus respectivos controles. No podemos descartar, sin embargo, que los conductos pancreáticos de las zonas más dañadas del páncreas, que resultan imposibles de aislar y cultivar con nuestro protocolo experimental, sí que presenten alteraciones importantes.

4.3. Efectos de la pancreatitis aguda inducida por L-arginina en la respuesta secretora de los conductos pancreáticos de rata

Con el fin de comprobar el efecto de la pancreatitis aguda inducida por L-arginina sobre la secreción ductular, hemos analizado y comparado la respuesta a forskolina en conductos pancreáticos aislados de ratas con este tipo de pancreatitis y de ratas controles.

La forskolina produce un incremento en el volumen luminal relativo de los conductos aislados de ratas control, tanto cuando se perfunden con tampón HEPES como con tampón HCO_3^- (Figura 48). Por el contrario, la estimulación de los conductos pancreáticos de ratas del grupo

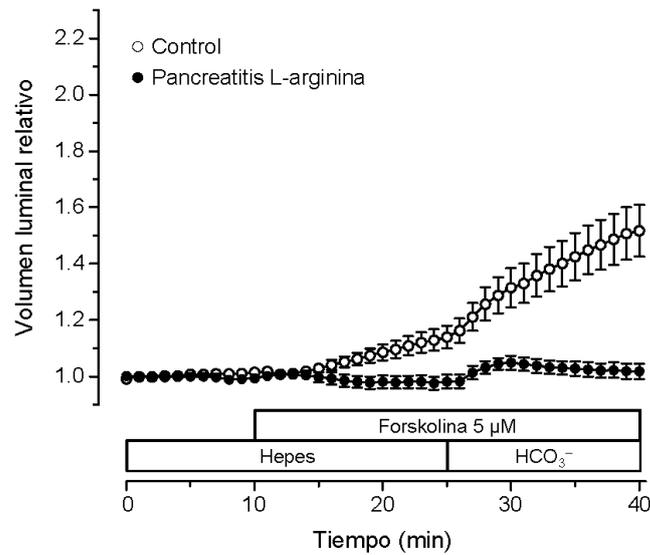


Figura 48. Secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por L-arginina. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos de ratas del grupo control (○, n=20) y del grupo pancreatitis (●, n=33), estimulados con forskolina 5 μM en solución HEPES y en solución HCO₃⁻. Los valores se expresan cada minuto como media ± S.E.M.

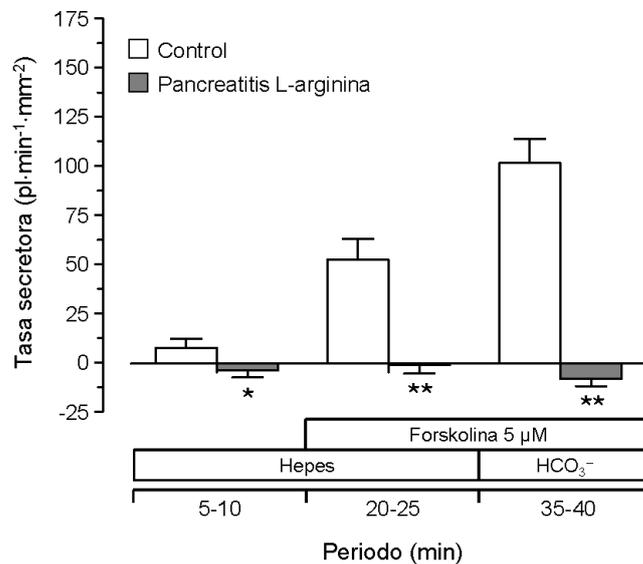


Figura 49. Secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por L-arginina. Tasa secretora en conductos de ratas del grupo control (□; n=20) y del grupo pancreatitis (■; n=33), estimulados con forskolina 5 μM en solución HEPES y en solución HCO₃⁻. Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 48 y se expresan como media ± S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ con respecto a los conductos de animales controles.

pancreatitis con forskolina no provoca cambios apreciables en el volumen luminal relativo de los conductos, ni durante la perfusión con HEPES ni con HCO_3^- . Sí que se observa en estos conductos un pequeño aumento en el volumen luminal relativo al cambiar el medio de perfusión de HEPES a HCO_3^- .

El análisis de las tasas secretoras (Figura 49) muestra que la adición de forskolina al medio de perfusión no produce ninguna respuesta secretora en conductos del grupo pancreatitis. Así, las tasas de secreción obtenidas en conductos del grupo pancreatitis en los periodos en los que el estímulo estuvo presente, son significativamente menores que las observadas en los conductos del grupo control, y no son significativamente distintas de cero en ninguno de los periodos analizados en el experimento.

La interpretación de nuestros resultados está dificultada por el hecho de que los mecanismos por los que la L-arginina induce pancreatitis aguda no se conocen en profundidad. Se ha descrito que en este proceso intervienen radicales libres de oxígeno,⁷⁰ óxido nítrico³³⁹ y mediadores inflamatorios.⁷¹ En cualquier caso, resulta imposible dilucidar si los cambios en alguno de estos factores pueden ser responsables de las alteraciones que hemos encontrado en la respuesta secretora de las células ductulares pancreáticas, puesto que hasta el momento no se ha investigado su eventual influencia en la funcionalidad de este tipo celular.

En 1999, Hegyi *et al.*¹³³ analizaron, en experimentos *in vivo* con animales anestesiados, la respuesta secretora del páncreas exocrino, en ratas con pancreatitis inducida por L-arginina, en las que usaron una dosis ligeramente inferior a la nuestra. Estos autores describen, a las 24 horas de la inducción de la pancreatitis (el mismo tiempo utilizado en nuestros experimentos), un incremento significativo de la secreción basal de fluido, con respecto a la de animales controles, junto con una reducción significativa de la secreción de proteínas. Además, también observaron una mayor secreción de fluido en respuesta a la estimulación con CCK-8 en los animales con pancreatitis. Lamentablemente, en ese trabajo no se determinó la concentración de HCO_3^- en el jugo pancreático, así que resulta imposible saber si esa mayor secreción hidroelectrolítica procede de los conductos; es probable que su origen sea acinar, ya que es bien sabido que, en la rata, la CCK induce un marcado aumento de la secreción de fluido en el jugo pancreático, procedente de las células acinares, con una composición iónica muy similar a la plasmática, es decir, con un bajo contenido en HCO_3^- .³⁰³ El origen ductular nos parece menos

probable, ya que, como se discutirá más adelante, hemos comprobado en este trabajo que la ceruleína, un análogo de la CCK, no provoca ningún tipo de respuesta secretora en conductos pancreáticos aislados de rata.

Hemos observado, en los estudios histológicos, que muchos de los conductos pancreáticos de animales con pancreatitis inducida por L-arginina presentan su lumen casi bloqueado por acúmulos de material eosinófilo que, muy probablemente, consisten en precipitados de proteínas secretadas por los acinos. Estos precipitados pueden formarse simplemente por la elevada concentración de proteínas, consecuencia de una falta de secreción de fluido que pueda arrastrarlas a lo largo del árbol ductal o, como se ha propuesto para explicar las alteraciones que aparecen en la fibrosis quística,²⁹² pueden también deberse a una disminución del pH del jugo pancreático, por una reducción en su concentración de HCO_3^- . En cualquier caso, nuestro resultado parece sugerir que, en este modelo de pancreatitis, ocurren alteraciones en la secreción de las células ductulares antes de verse afectada la de las acinares.

En resumen, hemos demostrado que, en el transcurso de la pancreatitis aguda inducida por L-arginina en la rata, se produce un bloqueo completo de la capacidad secretora de los conductos pancreáticos. Si esta falta de secreción ductular es una consecuencia de la enfermedad o es un acontecimiento temprano, implicado en su fisiopatología, será objeto de futuras investigaciones, en las que se tratará de reducir la gravedad de este modelo de pancreatitis (usando dosis menores de L-arginina) y se investigará la situación funcional de las células ductulares en esas condiciones.

4.4. Efectos de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína en la respuesta secretora de los conductos pancreáticos de rata

4.4.1. Estudio del posible efecto directo de la ceruleína sobre la respuesta secretora de conductos pancreáticos aislados de ratas controles

Nuestro siguiente objetivo fue analizar el efecto del tercer modelo experimental, la pancreatitis aguda inducida por hiperestimulación con ceruleína, sobre la secreción ductular.

Antes de abordarlo, nos planteamos estudiar el eventual efecto directo de la ceruleína sobre la respuesta secretora de los conductos; para ello, llevamos a cabo una serie de experimentos en los que analizamos el efecto de esta sustancia en conductos pancreáticos de ratas controles.

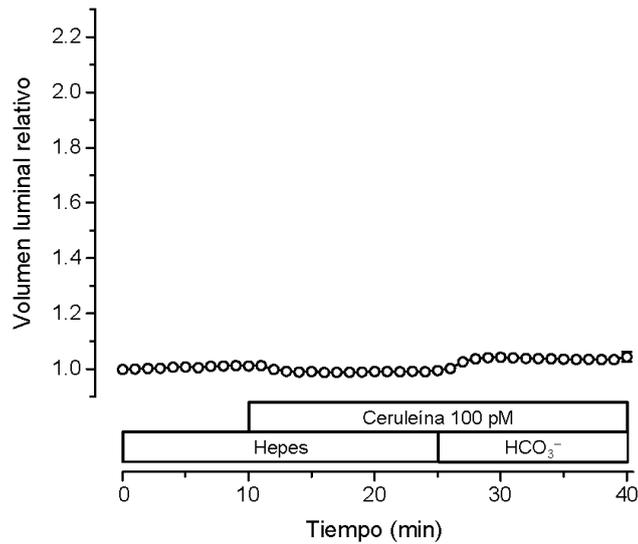


Figura 50. Secreción en presencia de ceruleína 100 pM en conductos pancreáticos de ratas controles. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con ceruleína 100 pM en solución HEPES y en solución HCO_3^- . Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M. (n=22).

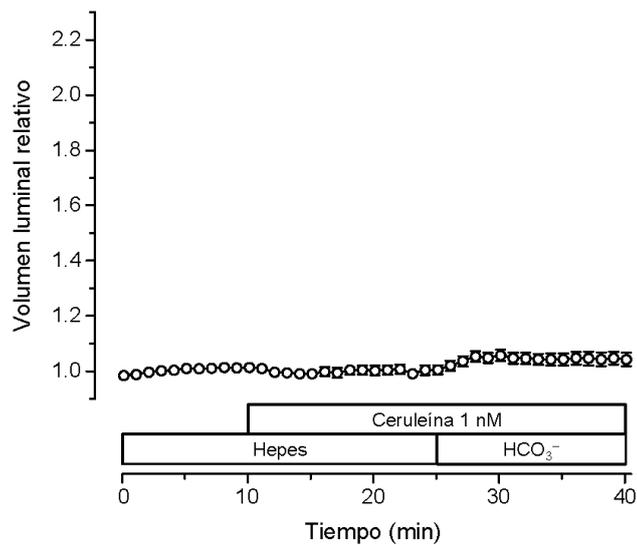


Figura 51. Secreción en presencia de ceruleína 1 nM en conductos pancreáticos de ratas controles. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos perfundidos con ceruleína 1 nM en solución HEPES y en solución HCO_3^- . Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M. (n=22).

Nuestros resultados demuestran que la adición al medio de perfusión de ceruleína, 100 pM o 1 nM, en HEPES o HCO_3^- , no provoca ningún cambio en el volumen luminal relativo de los conductos (Figuras 50 y 51). Los valores de tasas secretoras obtenidos tras la administración de ceruleína, a cualquiera de las dos concentraciones utilizadas, no son significativamente distintas de cero, según el test de la t de Student con respecto a la media poblacional (Figura 52).

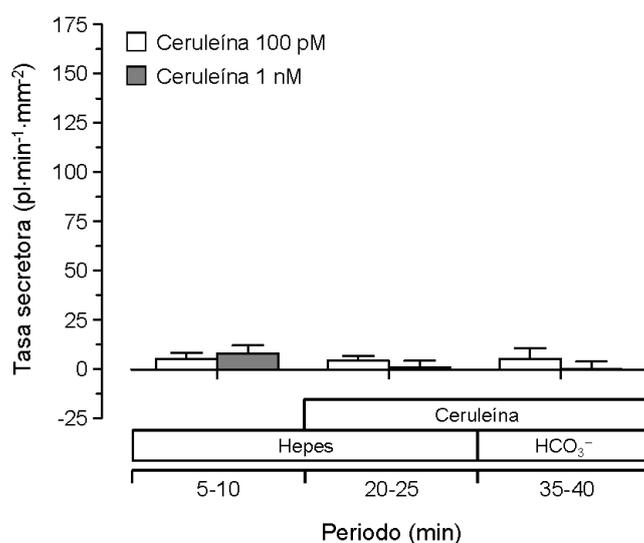


Figura 52. Secreción en presencia de ceruleína 100 pM o 1 nM en conductos pancreáticos de ratas controles. Tasa secretora en conductos estimulados con ceruleína 100 pM (□, n=22) o 1 nM (■, n=27) en solución HEPES y en solución HCO_3^- . Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en las figuras 50 y 51 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas.

La falta de respuesta secretora de los conductos pancreáticos de rata a la ceruleína confirma los resultados obtenidos por Argent *et al.* en 1986.¹² En nuestros experimentos hemos utilizado concentraciones inferiores del péptido, ya que la típica respuesta a la CCK es bifásica y cabría la posibilidad de que los resultados de Argent *et al.*¹² se debiesen al uso de una elevada concentración del agonista. En contraste con la falta de acciones de la CCK (o de la ceruleína) en las células ductulares de la rata, sí que se ha descrito un efecto estimulante de este péptido sobre la secreción de fluido y electrolitos en conductos pancreáticos aislados del cobaya, especie en la que sus acciones se ejercen a través de receptores del tipo CCK_1 .³³⁷

En definitiva, nuestros resultados confirman que la ceruleína no estimula la secreción en conductos pancreáticos aislados de la rata, y nos permiten descartar cualquier tipo de efecto directo de la hiperestimulación con este agonista sobre las células ductulares de esta especie.

4.4.2. Respuesta secretora a forskolina de conductos pancreáticos aislados de ratas controles y ratas con pancreatitis

Una vez comprobado que la ceruleína no ejerce un efecto directo sobre la secreción ductular, analizamos en qué medida la pancreatitis aguda inducida por hiperestimulación con ceruleína puede alterar esta secreción; para ello, realizamos una serie de experimentos en los que comparamos la respuesta a forskolina de conductos pancreáticos aislados de ratas con este tipo de pancreatitis y de ratas controles.

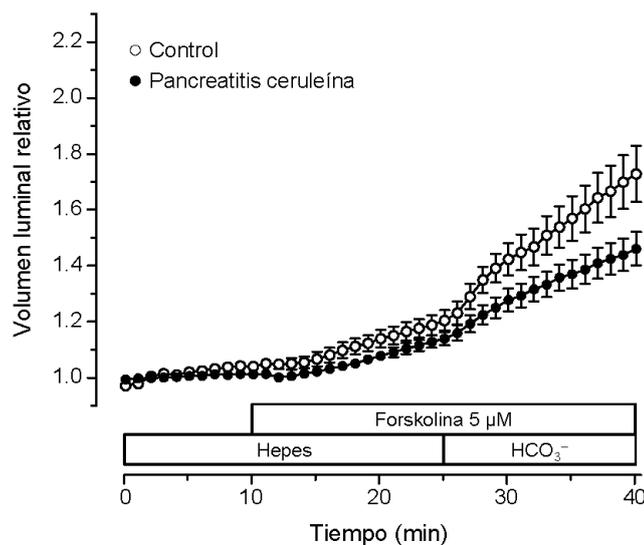


Figura 53. Secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos de ratas del grupo control (○, n=16) y del grupo pancreatitis (●, n=33), estimulados con forskolina 5 µM en solución HEPES y en solución HCO₃⁻. Los valores se expresan cada minuto como media ± S.E.M.

El volumen luminal relativo de los conductos aislados de ratas del grupo pancreatitis, perfundidos con solución HEPES, aumenta en presencia de forskolina. Esta respuesta es similar a la observada, en las mismas condiciones, en conductos del grupo control (Figura 53). Por el contrario, cuando los conductos del grupo pancreatitis se perfunden con tampón HCO₃⁻

y en presencia de forskolina, la pendiente del incremento del volumen luminal relativo es menor que la observada en el grupo control (Figura 53).

El análisis de las tasas secretoras confirma los resultados del volumen luminal relativo. La forskolina estimula de forma significativa la tasa secretora de los conductos en HEPES y HCO_3^- , tanto en el grupo control como en el grupo pancreatitis. Sin embargo, mientras que la respuesta secretora a forskolina en el tampón HEPES es similar en los dos grupos de animales, la respuesta al estímulo en el tampón HCO_3^- es significativamente menor en el grupo pancreatitis (Figura 54).

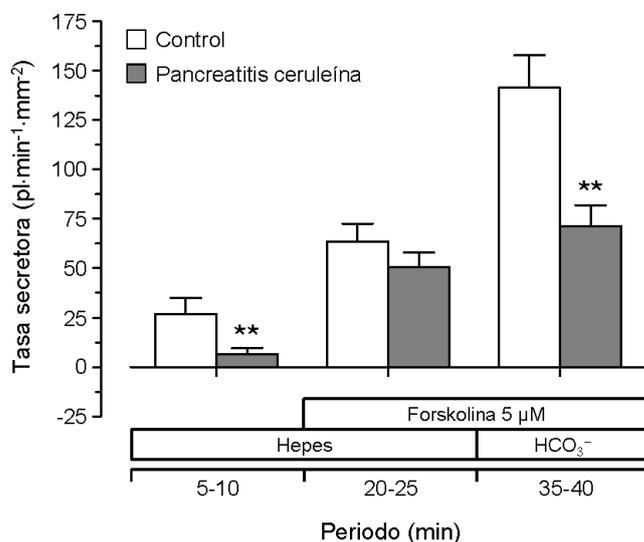


Figura 54. Secreción estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Tasa secretora en conductos de ratas del grupo control (□; n=16) y del grupo pancreatitis (■; n=33), estimulados con forskolina 5 μM en solución HEPES y en solución HCO_3^- . Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 53 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como ** $P < 0.01$ con respecto a los conductos de animales controles.

Estos resultados sugieren que la pancreatitis aguda inducida por hiperestimulación con ceruleína altera la secreción ductular pancreática, afectando selectivamente a la secreción dependiente de HCO_3^- .

Se ha analizado, en estudios *in vivo* en ratas anestesiadas, la respuesta secretora del páncreas exocrino a la estimulación con secretagogos tras la inducción de pancreatitis aguda por

hiperestimulación con ceruleína. Los resultados de estos trabajos no son fácilmente comparables, puesto que el efecto de la pancreatitis se ha analizado a distintos tiempos después de su inducción. Aun así, podemos encontrar en la bibliografía estudios en los que se describe que el tratamiento con ceruleína no modifica el flujo de jugo pancreático basal a las 9 horas de la inducción de la pancreatitis,^{223,224} frente a otros en los que se ha observado una hipersecreción de fluido, en situación basal, a las 12 horas de la inducción.^{68,69} Como hemos mencionado en el apartado correspondiente a la pancreatitis inducida por L-arginina, en la rata una parte considerable del fluido secretado por el páncreas procede de las células acinares, de forma que, para evaluar la contribución de las ductulares, es necesario cuantificar la secreción de HCO_3^- en el jugo pancreático. En este sentido, Manso *et al.*²²⁴ describieron que la secreción basal de HCO_3^- en el jugo pancreático no estaba modificada en ratas pancreatíticas, con respecto a la de controles, 9 horas después de la primera inyección de ceruleína; en contraste, Czako *et al.*⁶⁸ han descrito una disminución en la concentración basal de HCO_3^- en el jugo pancreático de ratas a las que se les había administrado ceruleína 24 horas antes. Estos mismos autores analizaron, en otro estudio,⁶⁹ la respuesta secretora del páncreas *in vivo* a la estimulación con secretina, y observaron que la concentración de HCO_3^- en el jugo pancreático de ratas pancreatíticas (24 horas después de la administración de ceruleína) era menor que en los animales controles tras la administración del péptido. Es evidente que estos resultados, obtenidos en modelos *in vivo*, no son fácilmente comparables a los obtenidos en conductos pancreáticos aislados; sin embargo, y salvando las distancias, es posible que la disminución en la secreción dependiente de HCO_3^- estimulada por forskolina que hemos observado en este trabajo, se vea reflejada en una alteración de la secreción de HCO_3^- *in vivo*, como la observada por Czako *et al.*⁶⁹ en ratas pancreatíticas que recibieron secretina por vía intravenosa.

4.4.3. Secreción de Cl^- en respuesta a la estimulación con forskolina en conductos pancreáticos aislados de ratas control y ratas con pancreatitis

Los resultados mostrados en el apartado anterior parecen indicar que la secreción de Cl^- en respuesta a forskolina no está alterada en los conductos de ratas con pancreatitis aguda inducida por hiperestimulación con ceruleína. Con el fin de confirmar estos resultados, realizamos una serie de experimentos en los que analizamos únicamente la secreción de Cl^- , utilizando HEPES como medio de perfusión a lo largo de todo el protocolo.

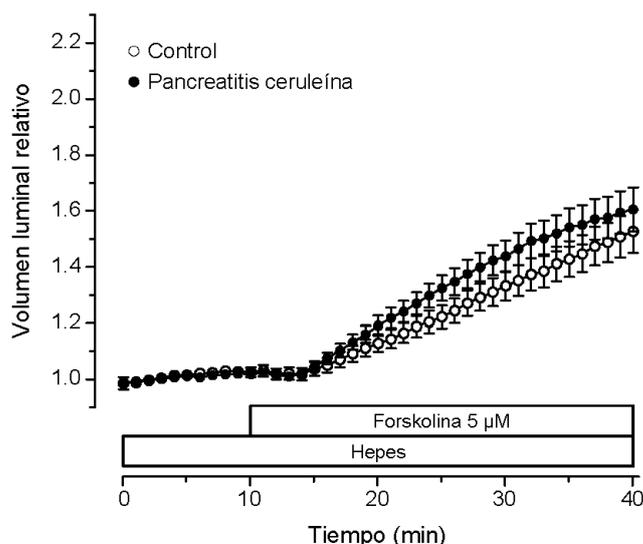


Figura 55. Secreción de Cl^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos de ratas del grupo control (\circ , $n=12$) y del grupo pancreatitis (\bullet , $n=21$), estimulados con forskolina $5 \mu M$ en solución HEPES. Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

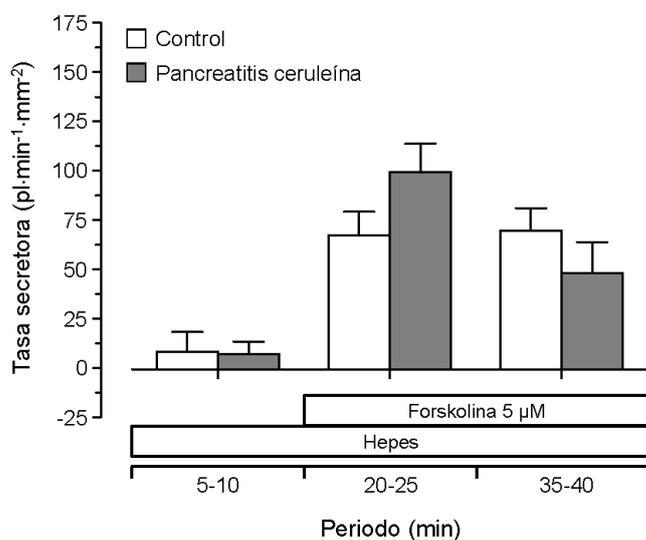


Figura 56. Secreción de Cl^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Tasa secretora en conductos de ratas del grupo control (\square ; $n=12$) y del grupo pancreatitis (\blacksquare ; $n=21$), estimulados con forskolina $5 \mu M$ en solución HEPES. Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 55 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas.

La forskolina provoca un claro incremento en el volumen luminal relativo y en las tasas secretoras en los conductos de ratas del grupo control y pancreatitis (Figuras 55 y 56), siendo el perfil de la respuesta secretora a forskolina muy similar en los conductos de ambos grupos (Figura 55).

Además, el análisis de las tasas secretoras (Figura 56) confirma que la forskolina estimula la secreción de Cl^- , tanto en conductos del grupo control como en conductos del grupo pancreatitis. El análisis estadístico de los resultados muestra que no existen diferencias significativas entre los dos grupos de ratas en ninguno de los periodos analizados.

Así pues, nuestros datos indican que, en la pancreatitis inducida por ceruleína, la secreción de Cl^- en los conductos pancreáticos no sufre ningún tipo de alteración; en contraste, la secreción dependiente de HCO_3^- está significativamente reducida con respecto a la de animales controles (Figura 54). Sabemos que, en la rata, la secreción dependiente de HCO_3^- está mediada por la actividad conjunta del NHE1 y del pNBC1,⁹¹ así que en los siguientes experimentos evaluamos por separado la funcionalidad de estos transportadores en conductos de ratas con pancreatitis inducida por ceruleína.

4.4.4. Papel del NHE1 en la secreción de HCO_3^- estimulada con forskolina en conductos pancreáticos aislados de ratas control y ratas con pancreatitis

Para evaluar la contribución del NHE1 en la secreción de HCO_3^- , realizamos una serie de experimentos en los que los conductos fueron perfundidos con tampón HCO_3^- , en presencia de los inhibidores bumetanida y H_2DIDS , condiciones en las que solo queda operativo el intercambiador NHE1 y en las que toda la secreción de fluido depende del transporte de HCO_3^- hacia el lumen ductular. En todos los casos se analizó la respuesta secretora de los conductos aislados de ratas control y con pancreatitis, tras la estimulación con forskolina.

Nuestros resultados muestran que la adición de forskolina $5 \mu\text{M}$ al tampón HCO_3^- , en presencia de bumetanida $30 \mu\text{M}$ y H_2DIDS $500 \mu\text{M}$, provoca un aumento en el volumen luminal relativo de los conductos, tanto del grupo control como del grupo pancreatitis. En el caso de los conductos aislados de ratas con pancreatitis, el incremento se mantiene a lo largo del tiempo, aunque con una pendiente ligeramente menor que la observada en los del grupo control (Figura 57).

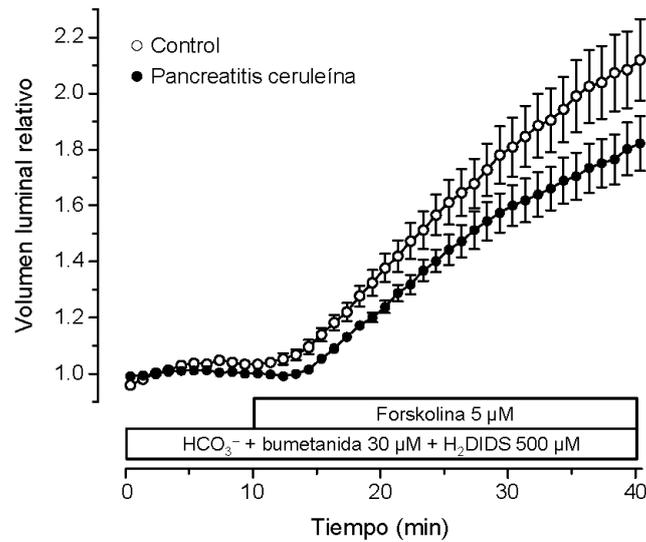


Figura 57. Papel del NHE1 en la secreción de HCO_3^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos de ratas del grupo control (\circ , $n=22$) y del grupo pancreatitis (\bullet , $n=20$), estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ en solución HCO_3^- conteniendo bumetanida $30 \mu\text{M}$ + H_2DIDS $500 \mu\text{M}$. Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

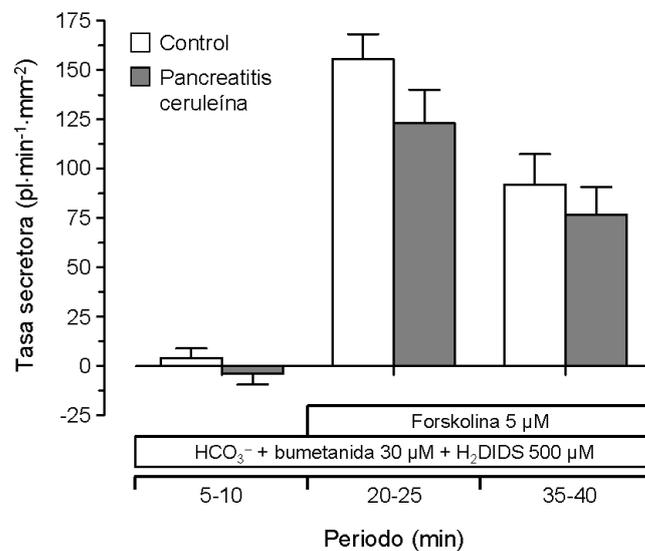


Figura 58. Papel del NHE1 en la secreción de HCO_3^- estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Tasa secretora en conductos de ratas del grupo control (\square ; $n=22$) y del grupo pancreatitis (\blacksquare ; $n=20$), estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ en solución HCO_3^- conteniendo bumetanida $30 \mu\text{M}$ + H_2DIDS $500 \mu\text{M}$. Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 57 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas.

Cuando se mantiene únicamente la actividad del intercambiador NHE1, los valores de tasa secretora alcanzados en el grupo control, en respuesta a la estimulación con forskolina, son algo superiores a los obtenidos en el grupo pancreatitis (Figura 58); en cualquier caso, de acuerdo con el análisis estadístico de los resultados, estas diferencias no son significativas.

Así pues, la pancreatitis inducida por ceruleína no altera de forma significativa la contribución del NHE1 en los procesos de acumulación de HCO_3^- en las células ductulares y su posterior secreción hacia el lumen de los conductos.

4.4.5. Papel del pNBC1 en la secreción dependiente de HCO_3^- estimulada con forskolina en conductos pancreáticos aislados de ratas control y ratas con pancreatitis

A continuación, analizamos la funcionalidad del otro transportador implicado en la secreción dependiente de HCO_3^- , el pNBC1. Aunque en este caso sí podemos utilizar un bloqueante específico para el NHE1, el EIPA, no podemos evitar mantener la actividad del intercambiador de aniones (AE) basolateral, al no existir bloqueante específico para este transportador. Por esta razón, hemos realizado experimentos usando bumetanida y EIPA, de forma que solo se mantienen operativos pNBC1 y AE. En todo caso, siendo el intercambiador aniónico basolateral un transportador electroneutro, con una estequiometría $1\text{Cl}^-:1\text{HCO}_3^-$, su contribución implicaría únicamente un cambio en la composición aniónica del líquido secretado hacia el lumen, y nunca una variación cuantitativa de esta secreción; en estas condiciones experimentales, la cantidad de fluido secretada hacia el lumen es directamente proporcional a la actividad del pNBC1.

Los resultados obtenidos en el volumen luminal relativo muestran que, en presencia de los bloqueantes, bumetanida $30\ \mu\text{M}$ y EIPA $3\ \mu\text{M}$, en tampón HCO_3^- , se pone de manifiesto una inhibición de la respuesta secretora a forskolina en conductos de ratas con pancreatitis, comparada con la de controles. Así, la pendiente del incremento en el volumen luminal relativo observada en conductos del grupo pancreatitis, tras la estimulación con forskolina, es mucho menor que la obtenida en los conductos del grupo control perfundidos en las mismas condiciones (Figura 59).

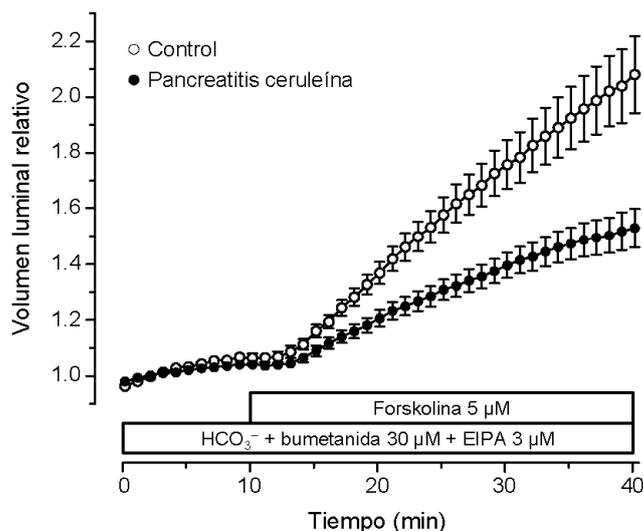


Figura 59. Papel del pNBC1 en la secreción dependiente de HCO₃⁻ estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos de ratas del grupo control (○, n=25) y del grupo pancreatitis (●, n=19), estimulados con forskolina 5 μM en solución HCO₃⁻ conteniendo bumetanida 30 μM + EIPA 3 μM. Los valores se expresan cada minuto como media ± S.E.M.

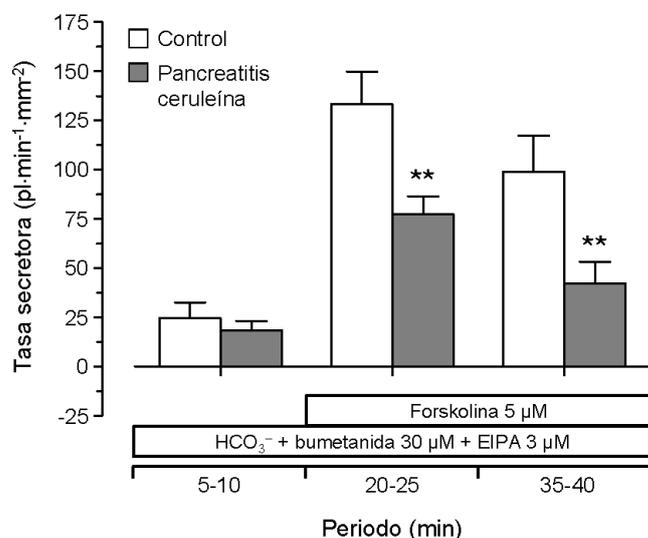


Figura 60. Papel del pNBC1 en la secreción dependiente de HCO₃⁻ estimulada por forskolina en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Tasa secretora en conductos de ratas del grupo control (□; n=25) y del grupo pancreatitis (■; n=19), estimulados con forskolina 5 μM en solución HCO₃⁻ conteniendo bumetanida 30 μM + EIPA 3 μM. Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 59 y se expresan como media ± S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como ** P < 0.01 con respecto a los conductos de ratas controles.

En presencia de los bloqueantes, los valores máximos de tasa secretora (Figura 60) en respuesta a forskolina obtenidos en conductos del grupo pancreatitis son menores que los observados en el grupo control ($76.8 \pm 9.2 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$ vs. $132.8 \pm 16.6 \text{ pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$). El análisis estadístico de estos resultados muestra que, en estas condiciones, la respuesta secretora a forskolina se reduce de forma significativa en conductos de ratas con pancreatitis con respecto a la del grupo control.

Estos resultados muestran que existe algún tipo de alteración en el funcionamiento de las células ductulares pancreáticas de la rata durante la pancreatitis aguda inducida por ceruleína, que afecta de forma específica al transporte de HCO_3^- a través del cotransportador pNBC1.

Podemos pensar al menos en tres posibilidades para explicar estos resultados. La primera de ellas sería la existencia de algún tipo de alteración en la expresión y/o maduración de la proteína pNBC1, que tendría como consecuencia una menor presencia de este cotransportador en la membrana basolateral de las células ductulares. La segunda estaría relacionada con la eventual regulación del pNBC1 por la elevación de los niveles de cAMP; si este tipo de regulación estuviese alterada como consecuencia de la pancreatitis, podríamos esperar una reducción de la actividad cotransportadora en presencia de forskolina. Finalmente, podemos pensar en algún tipo de efecto indirecto, mediado, por ejemplo, por alteraciones en el gradiente electroquímico que utiliza este cotransportador para realizar su función. Puesto que este es el único transportador electrogénico implicado en la acumulación de HCO_3^- en las células ductulares, un cambio en el potencial de membrana de estas podría ser responsable del efecto que hemos observado, en cuyo caso la alteración no se produciría en la proteína pNBC1.

4.4.6. Secreción dependiente de HCO_3^- en respuesta a la estimulación con carbacol en conductos pancreáticos aislados de ratas control y ratas con pancreatitis

Tras comprobar que la pancreatitis aguda inducida por ceruleína produce una reducción significativa de la secreción dependiente de HCO_3^- en los conductos estimulados con forskolina (Figura 54), y con el objeto de avanzar en la caracterización de esta alteración, quisimos comprobar si esta enfermedad puede afectar también a la secreción ductular en respuesta a carbacol $30 \mu\text{M}$.

Los conductos pancreáticos del grupo pancreatitis y del grupo control fueron perfundidos, durante todo el experimento, con tampón HCO_3^- en presencia de bumetanida $30 \mu\text{M}$. En estas condiciones, se elimina la secreción de Cl^- mediada por NKCC1 , por lo que la secreción que se produce es totalmente dependiente de la presencia de HCO_3^- en el medio de perfusión.

Nuestros resultados muestran que el volumen luminal relativo de los conductos del grupo pancreatitis aumenta en respuesta a la estimulación con carbacol. Este incremento, en el periodo de máxima secreción, es similar al que se observa en los conductos de ratas controles en respuesta al agonista (Figura 61). En los últimos minutos del experimento, en la fase de secreción más moderada en respuesta al carbacol, parece apreciarse una tendencia a una menor secreción en los conductos de ratas con pancreatitis.

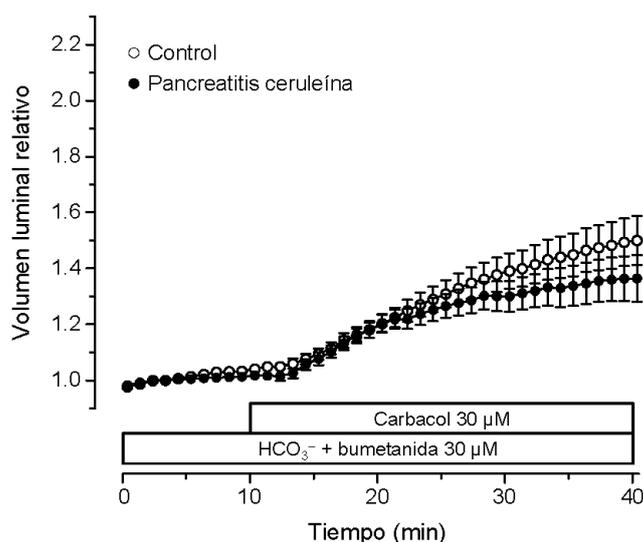


Figura 61. Secreción dependiente de HCO_3^- estimulada por carbacol en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos de ratas del grupo control (\circ , $n=26$) y del grupo pancreatitis (\bullet , $n=21$), estimulados con carbacol $30 \mu\text{M}$ en solución HCO_3^- conteniendo bumetanida $30 \mu\text{M}$. Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

El análisis de las tasas secretoras (Figura 62) confirma los resultados obtenidos para el volumen luminal relativo. El carbacol estimula la secreción dependiente de HCO_3^- en conductos de los grupos control y pancreatitis, y los valores máximos de tasa secretora que se alcanzan en respuesta al agonista son muy similares en ambos grupos, sin que existan diferencias significativas entre ellos. De acuerdo con lo observado en los cambios en el volumen luminal

relativo, la tasa secretora en el último periodo analizado (35'-40') alcanza valores menores en conductos de ratas con pancreatitis, aunque las diferencias con el control no llegan a alcanzar significación estadística.

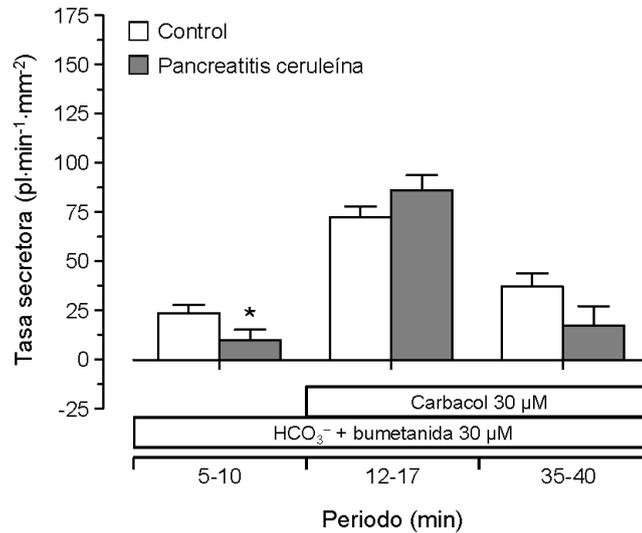


Figura 62. Secreción dependiente de HCO_3^- estimulada por carbacol en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Tasa secretora en conductos de ratas del grupo control (□; n=26) y del grupo pancreatitis (■; n=21), estimulados con carbacol 30 μM en solución HCO_3^- conteniendo bumetanida 30 μM . Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 61 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como * $P < 0.05$ con respecto a los conductos de ratas controles.

Según estos resultados, la secreción dependiente de HCO_3^- no está afectada de manera significativa en respuesta a la estimulación con el agonista colinérgico en las células ductulares de ratas con pancreatitis inducida por ceruleína. A pesar de ello, y puesto que en los experimentos con forskolina habíamos detectado una clara disminución de la secreción mediada por el pNBC1, realizamos otra serie de experimentos, en los que analizamos la respuesta secretora al carbacol en condiciones en las que la secreción de fluido y electrolitos depende solo de la actividad de este cotransportador (tampón HCO_3^- con bumetanida y EIPA).

4.4.7. Papel del pNBC1 en la secreción de HCO_3^- estimulada con carbacol en conductos pancreáticos aislados de ratas control y ratas con pancreatitis

En la Figura 63 se puede observar que la pendiente máxima del incremento del volumen luminal relativo de los conductos pancreáticos estimulados con carbacol, en presencia de bumetanida $30 \mu\text{M}$ y EIPA $3 \mu\text{M}$, fue muy similar en los grupos control y pancreatitis. Del mismo modo, los valores de las tasas secretoras correspondientes al periodo de máxima secreción tras la estimulación con carbacol, alcanzaron valores muy similares en ambos grupos (Figura 64). Al igual que sucedía en el apartado anterior, en el que analizábamos la totalidad de la secreción dependiente de HCO_3^- , hacia el final del experimento se aprecia una menor pendiente del incremento del volumen luminal relativo (Figura 63), que se ve reflejada en un menor valor de tasa secretora (Figura 64) que, sin embargo, no es significativamente diferente del alcanzado en conductos pancreáticos de ratas controles.

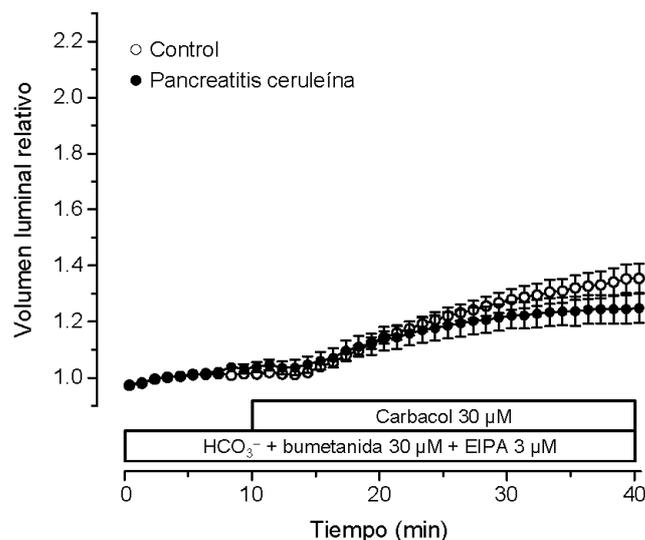


Figura 63. Papel del pNBC1 en la secreción dependiente de HCO_3^- estimulada por carbacol en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Cambios en el volumen luminal relativo en conductos de ratas del grupo control (\circ , $n=23$) y del grupo pancreatitis (\bullet , $n=15$), estimuladas con carbacol $30 \mu\text{M}$ en solución HCO_3^- conteniendo bumetanida $30 \mu\text{M}$ + EIPA $3 \mu\text{M}$. Los valores se expresan cada minuto como media \pm S.E.M.

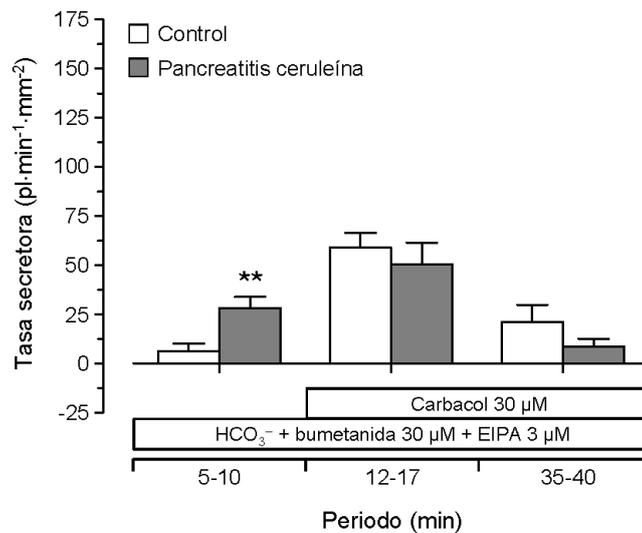


Figura 64. Papel del pNBC1 en la secreción dependiente de HCO_3^- estimulada por carbacol en conductos pancreáticos de ratas controles y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Tasa secretora en conductos de ratas del grupo control (□; n=23) y del grupo pancreatitis (■; n=15), estimulados con carbacol 30 μM en solución HCO_3^- conteniendo bumetanida 30 μM + EIPA 3 μM . Los valores se han obtenido de los experimentos mostrados en la figura 63 y se expresan como media \pm S.E.M. para cada uno de los periodos de tiempo que se especifican en el eje de ordenadas. Los resultados del test de la t de Student se muestran como ** $P < 0.01$ con respecto a los conductos de ratas controles.

En su conjunto, los datos obtenidos en estos experimentos en los que utilizamos carbacol parecen indicar que la pancreatitis aguda inducida por ceruleína no provoca ninguna alteración significativa en la secreción dependiente de HCO_3^- en respuesta a este agonista. Además, la contribución del pNBC1 a la secreción fue similar en ratas controles y con pancreatitis.

Si volvemos a las tres posibilidades que habíamos postulado para explicar la disminución de la secreción mediada por el pNBC1 en respuesta a la forskolina, parece lógico pensar que la primera de ellas, una alteración en la expresión y/o maduración de la proteína pNBC1, no podría explicar los resultados obtenidos con carbacol. No obstante, el hecho de que en conductos pancreáticos de ratas controles, manteniendo únicamente la actividad de este cotransportador, la forskolina induzca una secreción de fluido del orden de 135 $\text{pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$, mientras que en presencia de carbacol la máxima tasa secretora sea del orden de 60 $\text{pl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$, plantea la posibilidad de que en la respuesta al carbacol la actividad del pNBC1 no sea el factor limitante, en cuyo caso la posible alteración en esta proteína no se

manifestaría tan claramente en los resultados de los experimentos en conductos de ratas con pancreatitis.

La hipótesis de una alteración en algún mecanismo de regulación positiva de la actividad del pNBC1 por el cAMP encajaría bastante bien con estos resultados: la respuesta a la forskolina podría estar disminuida porque el cAMP no consiga activar adecuadamente a pNBC1, mientras que en respuesta al carbacol este hipotético mecanismo de regulación no intervendría en la secreción mediada por este cotransportador.

Finalmente, no podemos descartar que las alteraciones observadas durante la pancreatitis sean consecuencia de un efecto indirecto, mediado por cambios en el gradiente electroquímico a través de la membrana basolateral. Hace años que se analizaron los cambios en el potencial eléctrico de esta membrana provocados por la estimulación con diversos agonistas, en células ductulares pancreáticas de la rata. En estos estudios se describió que tanto la secretina²⁴³ como el carbacol^{149,253} provocan una marcada despolarización de la membrana basolateral, lo que favorecería la actividad del pNBC1, cuyo efecto neto, desde un punto de vista eléctrico, es la entrada a la célula de una carga negativa. Esta despolarización se ha atribuido a la apertura de canales aniónicos en la membrana luminal.²⁵³ Sin embargo, algunos de estos resultados son bastante confusos. En primer lugar, la despolarización inducida por secretina parece ser mucho más duradera, manteniéndose un cierto tiempo tras la retirada del agonista,²⁵³ mientras que la inducida por el carbacol es mucho más transitoria y, en este caso, la recuperación de los valores iniciales de potencial de membrana es mucho más rápida tras la retirada del agonista del medio.¹⁴⁹ Por otra parte, los mismos autores han descrito que el ATP, un agonista que, al igual que el carbacol, actúa por la vía del Ca^{2+} , induce una hiperpolarización de la membrana basolateral, atribuida en este caso a la apertura de los maxi-canales de K^+ situados en ella.¹⁴⁹ No parece fácil explicar cómo el incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico puede provocar en un caso, pero no en el otro, un incremento en la conductancia al K^+ . Con estas consideraciones, no podemos descartar que las acciones de la forskolina y el carbacol sobre el potencial de membrana de las células ductulares sean intrínsecamente diferentes, o que la pancreatitis inducida por ceruleína altere la despolarización inducida por la forskolina o por el carbacol. Así pues, no estamos en condiciones de descartar que, como consecuencia de

la pancreatitis aguda, se produzcan diferencias en el potencial de membrana, que afectarían a la respuesta secretora a la forskolina mediada por pNBC1.

4.5. Análisis de la funcionalidad de transportadores de membrana, por medida del pH intracelular, en la pancreatitis aguda inducida por ceruleína

Con el fin de continuar caracterizando las alteraciones en la contribución del cotransportador $\text{Na}^+2\text{HCO}_3^-$ (pNBC1) a la secreción estimulada por forskolina, en conductos de ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína, hemos utilizado un método adicional basado en el análisis del pH_i de las células ductulares. El protocolo experimental consiste en analizar la recuperación de una carga ácida, inducida por exposición al ion NH_4^+ y su posterior retirada del medio (Figura 8 del apartado de *Materiales y Métodos*); tras este procedimiento, los valores normales de pH_i se pueden recuperar por dos mecanismos, o bien sacando H^+ de la célula, o bien introduciendo en el citoplasma HCO_3^- , lo que neutralizará el exceso de H^+ . En la primera maniobra de salida de H^+ puede intervenir el NHE1 de la membrana basolateral, y también podría participar una H^+ -ATPasa, cuya presencia se ha descrito en conductos pancreáticos de distintas especies.^{239,386} En cuanto a la segunda posibilidad, siempre que haya HCO_3^- en el medio, y de acuerdo con los resultados en otras especies, el pNBC1 sería el principal responsable de la entrada de este anión en la célula, sin que podamos descartar una cierta contribución del intercambiador aniónico basolateral (AE).

4.5.1. Recuperación del pH_i tras una carga ácida en células ductulares pancreáticas de ratas normales y ratas con pancreatitis

En la Figura 65 se muestran registros representativos del pH_i obtenidos en conductos pancreáticos de ratas normales (Figura 65A) y con pancreatitis (Figura 65B) en ausencia de bloqueantes (situación control para estos experimentos). Los conductos se perfundieron en un medio con HCO_3^- , cuya composición fue la misma que en los experimentos de secreción. El pH_i inicial de los conductos perfundidos en presencia de HCO_3^- es similar en el grupo de ratas normales (7.397 ± 0.023 , n=8) y con pancreatitis (7.405 ± 0.042 , n=10). Estos valores de pH_i en reposo son superiores a los que se pueden encontrar en la mayoría de los tipos celulares, hecho que parece estar relacionado con la implicación de estas células en procesos de

acumulación y secreción de HCO_3^- .¹⁵⁴ Tras perfundir los conductos con esta solución durante 4 minutos, se pasó a un medio de igual osmolaridad pero con NH_4Cl 20 mM (retirando 20 mM de NaCl) durante 2 minutos; esta maniobra provoca una inmediata alcalinización del citoplasma, alcanzándose valores de pH_i de 7.708 ± 0.033 (n=8) en conductos de ratas normales y 7.778 ± 0.041 (n=10) en los de ratas con pancreatitis; estos valores no son significativamente diferentes al aplicar el test de la t de Student.

A continuación, y como consecuencia de la retirada de NH_4^+ del medio, se produjo una marcada acidificación del citoplasma. El valor medio de pH_i tras esta acidificación fue 6.638 ± 0.028 en ratas normales (n=8) y 6.654 ± 0.036 en ratas con pancreatitis (n=10), no existiendo diferencias significativas entre ambos grupos.

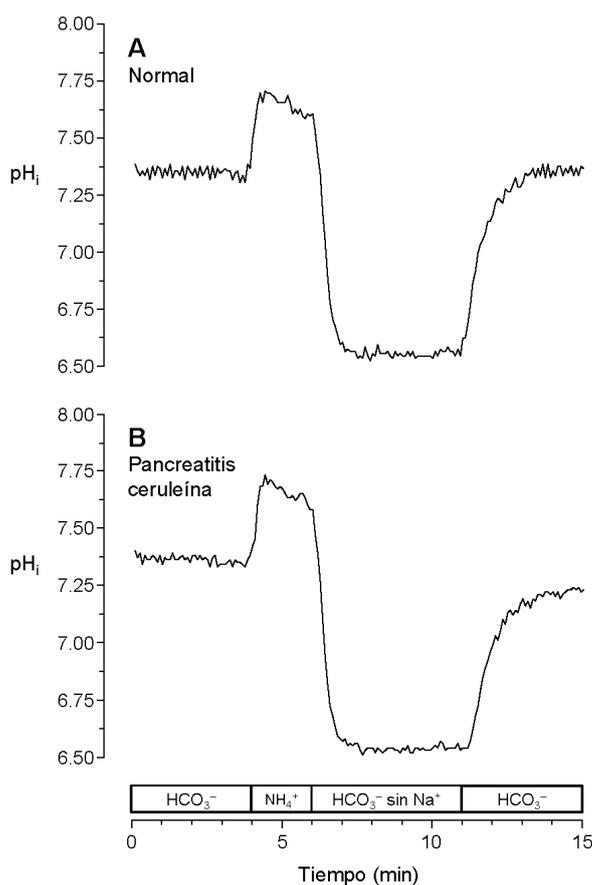


Figura 65. Recuperación de una carga ácida en conductos de ratas normales y de ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Registros de los cambios en el pH_i de un conducto de rata normal (A) y de un conducto de rata con pancreatitis (B), tras un pulso de NH_4Cl y la perfusión en ausencia de Na^+ . Los registros son representativos de un total de 8 experimentos en ratas normales y 10 en ratas con pancreatitis.

En estos registros, representativos de los obtenidos en experimentos similares, se observa cómo, en ausencia de Na^+ extracelular, no hay ninguna recuperación del pH_i . Estos resultados indican que este proceso de recuperación del pH_i se llevaría a cabo gracias a la intervención conjunta del NHE1 y el pNBC1 basolaterales. Esto se confirma cuando se añade Na^+ al medio, ya que, inmediatamente después, se observa una rápida recuperación del pH_i hasta valores semejantes a los iniciales.

Aunque en la mayoría de los experimentos realizados no se observó recuperación del pH_i en un medio sin Na^+ , sí hubo un pequeño porcentaje de registros, tanto en conductos de ratas normales como de ratas con pancreatitis, donde la falta de Na^+ no impidió una cierta recuperación del pH_i , como se puede observar en la Figura 66. De acuerdo con un trabajo realizado por Zhao *et al.*,³⁸⁶ es probable que esta recuperación se deba a la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar basolateral, ya que la actividad de esta bomba es independiente de la presencia de Na^+ en el medio de perfusión; de esta forma, la célula podría bombear H^+ hacia el exterior y recuperar el pH_i hacia valores normales. En cualquier caso, parece que la función

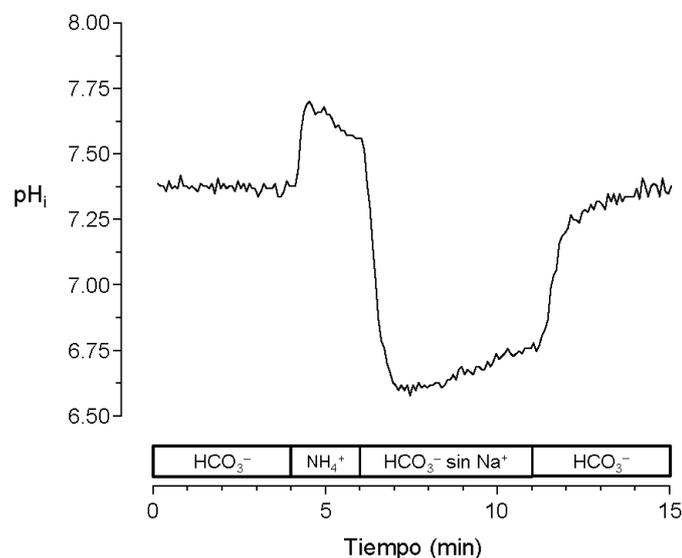


Figura 66. Recuperación de una carga ácida en un conducto de rata normal. Registro de los cambios en el pH_i de un conducto de rata normal, tras un pulso de NH_4Cl y la perfusión en ausencia de Na^+ . Se observa una lenta recuperación del pH_i en ausencia de Na^+ en el medio de perfusión. El registro es representativo de un total de 8 experimentos.

de esta H^+ -ATPasa vacuolar sería importante para la recuperación de pH_i cuando este disminuye hasta valores muy bajos, pero su actividad no parece ser relevante a valores de pH_i cercanos a los fisiológicos y, por lo tanto, en los procesos de secreción ductular.³⁸⁶

Con el fin de analizar si la recuperación de pH_i se ve afectada por la actividad deficiente de alguno de los transportadores implicados, realizamos estudios de la recuperación del pH_i tras una carga ácida, en presencia de bloqueantes del NHE1, pNBC1 y AE. En las siguientes Figuras (67-69) se muestran registros representativos, obtenidos en presencia de EIPA y/o H_2DIDS ,

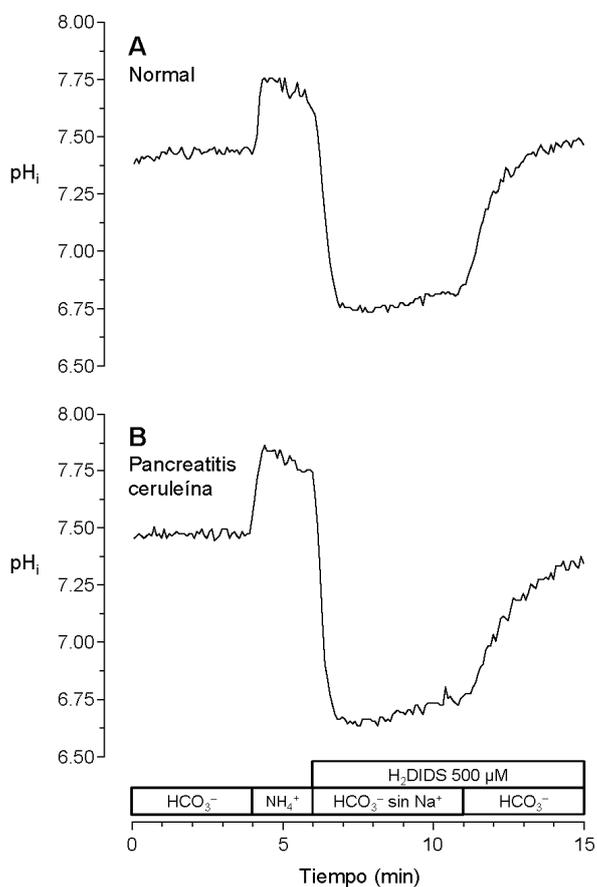
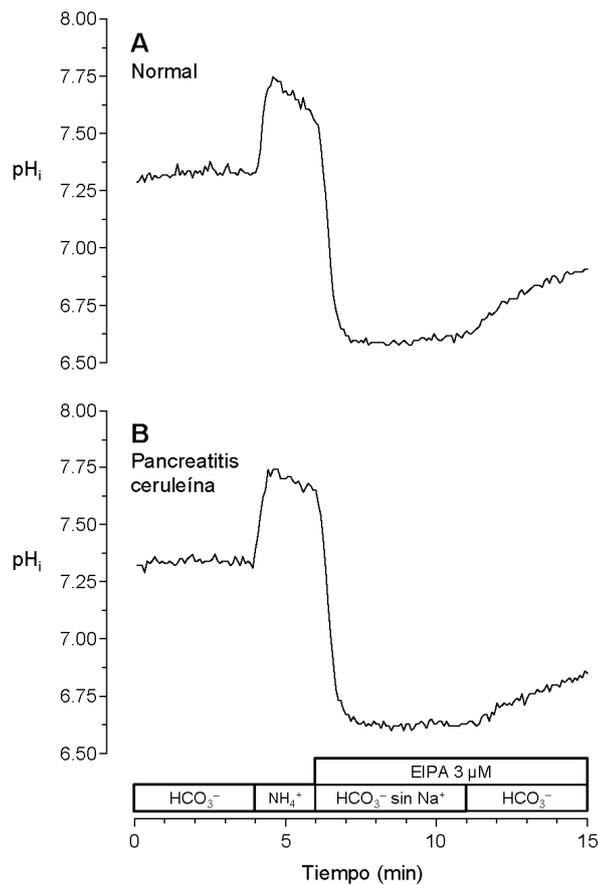


Figura 67. Efecto de la inhibición de los transportadores pNBC1 y AE sobre la recuperación de una carga ácida en conductos de ratas normales y de ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Registros de los cambios en el pH_i de un conducto de rata normal (A) y de un conducto de rata con pancreatitis (B), tras un pulso de NH_4Cl y la perfusión en ausencia de Na^+ , en presencia de H_2DIDS 500 μM . Los registros son representativos de un total de 10 experimentos en ratas normales y 9 en ratas con pancreatitis.

en conductos de ratas normales y de ratas con pancreatitis. En todos los casos, los bloqueantes se añadieron al medio de perfusión en la solución libre de Na^+ , y se mantuvieron hasta el final del experimento, de forma que nos aseguramos de que ya están actuando en el momento en el que se añade Na^+ al medio de perfusión.



En la Figura 67 se muestran los registros representativos del pH_i en conductos pancreáticos de ratas normales (Figura 67A) y en conductos de ratas con pancreatitis (Figura 67B) perfundidos con medio HCO_3^- en presencia de H_2DIDS $500 \mu\text{M}$, bloqueante del pNBC1 y del AE. En estos registros se observa que, en presencia del H_2DIDS , el pH_i se recupera hasta valores similares a los obtenidos en ausencia del bloqueante (Figura 65), tanto en conductos de

ratas normales como en conductos de ratas con pancreatitis. Sin embargo, observamos que la pendiente de recuperación del pH_i es menor en los conductos tratados con H_2DIDS (Figura 67) que en los conductos perfundidos en ausencia del bloqueante (Figura 65).

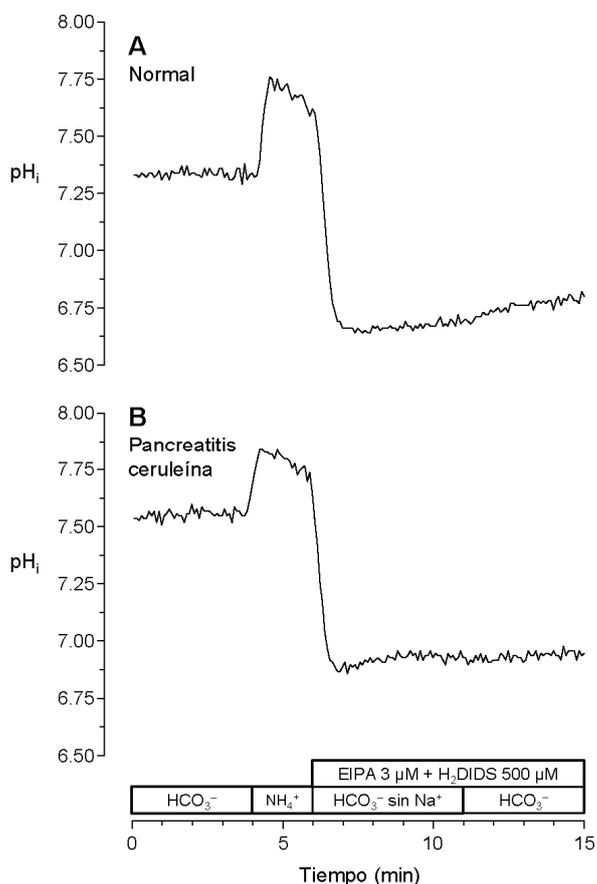


Figura 69. Efecto de la inhibición de los transportadores $pNBC1$, $NHE1$ y AE sobre la recuperación de una carga ácida en conductos de ratas normales y de ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Registros de los cambios en el pH_i de un conducto de rata normal (A) y de un conducto de rata con pancreatitis (B), tras un pulso de NH_4Cl y la perfusión en ausencia de Na^+ , en presencia de $EIPA\ 3\ \mu M + H_2DIDS\ 500\ \mu M$. Los registros son representativos de un total de 10 experimentos en ratas normales y 10 en ratas con pancreatitis.

En otra serie de experimentos analizamos el efecto de la perfusión de los conductos con $EIPA\ 3\ \mu M$, el bloqueante específico del $NHE1$, sobre la recuperación de pH_i en conductos de ratas normales (Figura 68A) y con pancreatitis (Figura 68B). Los registros nos muestran que la presencia de $EIPA$ en el medio de perfusión inhibe parcialmente la recuperación del pH_i con respecto a la observada en ausencia del bloqueante (Figura 65). Esta inhibición, que se pone de manifiesto tanto en los conductos de ratas normales (Figura 68A) como en los conductos de

animales con pancreatitis (Figura 68B), es más acusada que la obtenida con H₂DIDS (Figura 67).

Finalmente, realizamos experimentos con conductos de ratas normales y con pancreatitis perfundidos en presencia de EIPA y H₂DIDS, de forma que se consigue inhibir la actividad de los tres transportadores basolaterales. En los registros representativos de estos experimentos (Figura 69), se observa que la administración conjunta de los dos bloqueantes produce una inhibición casi total en la recuperación del pH_i tras la carga ácida de los conductos, tanto en los procedentes de ratas normales (Figura 69A) como en los obtenidos de ratas con pancreatitis (Figura 69B).

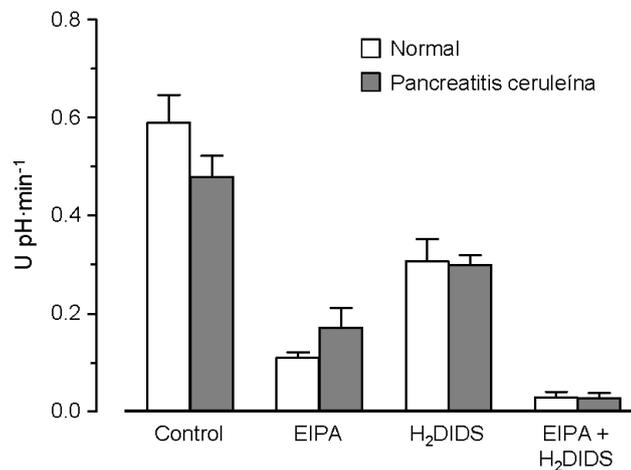


Figura 70. Efecto del bloqueo de los transportadores pNBC1, NHE1 y AE sobre la velocidad de la recuperación del pH_i tras una carga ácida en conductos de ratas normales y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Los conductos de ratas normales (□) y con pancreatitis (■) fueron perfundidos en ausencia de inhibidores (control; □ n=8, ■ n=10), en presencia de EIPA 3 μM (□ n=11; ■ n=12), de H₂DIDS 500 μM (□ n=10; ■ n=9) o de EIPA 3 μM + H₂DIDS 500 μM (□ n=10; ■ n=10). Los valores se expresan como media ± S.E.M. de la pendiente de recuperación del pH_i.

En la Figura 70 se representa la velocidad de recuperación del pH_i (unidades de pH·min⁻¹) en ratas normales y con pancreatitis, en ausencia de bloqueantes (control), en presencia de EIPA, en presencia de H₂DIDS y con la combinación de ambos. Estos resultados demuestran que, tanto el EIPA como el H₂DIDS, inhiben parcialmente la tasa de recuperación de pH_i en conductos aislados de animales de ambos grupos. Esta inhibición es mayor cuando los conductos se perfunden con EIPA, lo que significa que, en estas condiciones, la actividad del NHE1 juega un papel más importante que la del pNBC1 en la recuperación de pH_i. Estos

resultados coinciden con los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación en conductos pancreáticos de ratón, en los que se observó que, aunque la contribución del NHE1 y del pNBC1 a la secreción de fluido es relativamente similar,⁹¹ la recuperación del pH_i tras una carga ácida depende en mayor medida de la actividad de NHE1.²⁵⁵ Por otro lado, la combinación de ambos bloqueantes inhibe de forma muy marcada la recuperación del pH_i en los conductos del grupo de animales normales y con pancreatitis.

El análisis estadístico de los resultados de velocidad de recuperación del pH_i (Figura 70) muestra que no existen diferencias significativas entre ratas normales y ratas con pancreatitis en ninguna de las situaciones experimentales, es decir, la velocidad de entrada de HCO_3^- y/o la de salida de H^+ de la célula son similares en los animales a los que se les induce pancreatitis aguda mediante hiperestimulación con ceruleína y en los controles. Estos resultados parecen indicar que no existe ningún tipo de alteración significativa en los transportadores de membrana implicados en estos procesos, lo que nos lleva a descartar la primera de las hipótesis que manejábamos para explicar la reducción en la secreción de fluido mediada por pNBC1, es decir, que haya algún tipo de cambio en la expresión y/o maduración de esta proteína durante la pancreatitis aguda inducida por ceruleína. De existir este tipo de alteraciones en el pNBC1, se deberían manifestar con una reducción de la velocidad de recuperación del pH_i , en presencia de EIPA, en los conductos procedentes de ratas con pancreatitis.

Por otro lado, analizamos las unidades de pH no recuperadas al finalizar los experimentos, es decir, la diferencia entre los valores iniciales y finales de pH_i (Figura 71). Los resultados del test de la t de Student solo muestran diferencias significativas entre el grupo de ratas normales y de ratas con pancreatitis cuando se analiza esta variable en situación control. Así, cuando los conductos de ratas normales se perfunden en ausencia de bloqueantes, se observa una recuperación completa del pH_i , alcanzándose, al final del experimento, valores muy similares a los iniciales. Sin embargo, en los controles de las ratas con pancreatitis, se observa una cierta recuperación del pH_i , que no llega a alcanzar los valores de pH_i iniciales, de forma que las cerca de 0.1 unidades de pH no recuperadas resultan, en este caso, significativamente diferentes de cero. En cuanto a los resultados obtenidos para el resto de grupos experimentales se observa que, para ambos grupos de ratas, las unidades de pH no

recuperadas en presencia de EIPA son altas y significativamente distintas de cero. Los mismos resultados se obtienen al analizar la tasa de recuperación de pH en presencia de los dos bloqueantes. Por último, las unidades de pH no recuperadas, en presencia únicamente de H₂DIDS, no son significativamente distintas de cero en ratas normales, pero sí lo son en ratas con pancreatitis.

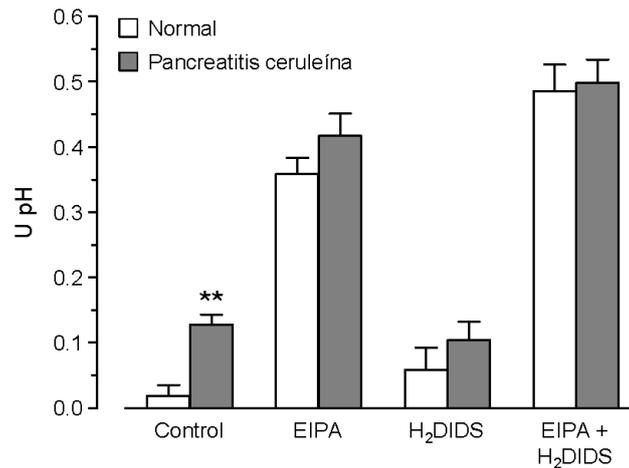


Figura 71. Efecto del bloqueo de los transportadores pNBC1, NHE1 y AE sobre las unidades de pH no recuperadas en conductos de ratas normales y ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Los conductos de ratas normales (□) y con pancreatitis (■) fueron perfundidos en ausencia de inhibidores (control; □ n=8, ■ n=10), en presencia de EIPA 3 μM (□ n=11; ■ n=12), de H₂DIDS 500 μM (□ n=10; ■ n=9) o de EIPA 3 μM + H₂DIDS 500 μM (□ n=10; ■ n=10). Los valores se obtuvieron calculando la diferencia entre el pH_i al inicio y al final del experimento y se expresan como media ± S.E.M. Los resultados del test de la t de Student se muestran como ** P < 0.01 con respecto a los valores obtenidos en ratas normales.

En conductos pancreáticos de ratón se ha podido comprobar que la exposición a forskolina, en tampón HCO₃⁻, provoca una ligera acidificación intracelular, de alrededor de 0.075 unidades de pH.²⁵⁵ Aunque no disponemos de datos similares en células ductulares de la rata, conviene mencionar que hasta la fecha no se ha encontrado ningún tipo de diferencia entre los mecanismos de secreción de agua y electrolitos de ambas especies.⁹¹ Se cree que la ligera acidificación de las células ductulares del ratón estimuladas con forskolina se debe al hecho de que los mecanismos de salida del HCO₃⁻ hacia el lumen del conducto no son el factor limitante en los procesos de secreción, y que este factor limitante habría que buscarlo más bien en los mecanismos basolaterales encargados de la acumulación de HCO₃⁻ en el citosol.²⁵⁵ Esto contrasta con lo observado en el cobaya, especie en la que los fenómenos de entrada y

salida de HCO_3^- de la célula se encuentran perfectamente acoplados, de forma que la estimulación con forskolina no provoca ningún cambio apreciable en los valores de pH_i .¹⁵⁴ De acuerdo con esto, en los conductos pancreáticos del ratón, y presumiblemente en los de la rata, la estimulación con forskolina provocará un incremento en el flujo de HCO_3^- a través de la membrana luminal, que está asociado a una disminución del pH (inferior a 0.1 unidades), y que generará el gradiente químico favorable para el funcionamiento de los transportadores basolaterales responsables de la entrada de HCO_3^- a la célula. Además, la despolarización de la membrana basolateral, consecuencia del incremento de la conductancia aniónica de la luminal,²⁴³ también colaborará en el proceso, mejorando el gradiente eléctrico para el funcionamiento del pNBC1.

Los resultados obtenidos en el análisis de la recuperación del pH_i tras una carga ácida muestran que, en contraste con la vuelta de esta variable a sus valores iniciales en conductos de ratas normales, en ausencia de bloqueantes en el medio, en los procedentes de ratas con pancreatitis se alcanzan valores finales que son significativamente menores que los iniciales; en concreto la diferencia entre ambos es ligeramente superior a las 0.1 unidades de pH (Figura 71). Hay que considerar que en el periodo final del experimento las células ductulares de ratas con pancreatitis han llegado a los valores de pH_i que se pueden esperar tras la estimulación con forskolina, y que estos valores no se recuperan hasta los iniciales (alrededor de 7.4), a pesar de que se mantienen todas las condiciones necesarias para el correcto funcionamiento de los transportadores basolaterales. En definitiva, estos resultados sugieren la existencia de algún tipo de alteración en los mecanismos basolaterales de transporte de HCO_3^- , consecuencia de la pancreatitis inducida por ceruleína, que los convierte en un factor más limitante para la secreción de HCO_3^- que en los conductos de ratas controles, y que está de acuerdo con nuestros resultados de secreción dependiente de HCO_3^- en conductos aislados de estos animales.

En los experimentos de secreción llegábamos a la conclusión de que el responsable de la menor secreción dependiente de HCO_3^- en ratas con pancreatitis era el mal funcionamiento del pNBC1. En presencia de EIPA en el medio de perfusión, el pH_i al final del experimento fue alrededor de 0.4 unidades de pH menor que el inicial; aunque las unidades de pH no recuperadas fueron ligeramente superiores en los conductos de ratas con pancreatitis que en

los de normales, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos de animales. Pensamos que estos resultados hay que interpretarlos considerando que, en células ductulares de ratas normales, a pesar de la plena funcionalidad del pNBC1, el bloqueo del NHE1 impide que el pH_i se recupere hasta los valores iniciales, quedando la célula considerablemente acidificada al final del experimento. Cualquier alteración en el pNBC1 que impida su correcto funcionamiento en un rango de pH cercano al fisiológico sería indetectable en este tipo de protocolo experimental. Sin embargo, esta alteración sí se podría poner de manifiesto cuando el pH_i , gracias a la actuación combinada de NHE1 y pNBC1, fuese ya cercano al valor de partida.

4.5.2. Papel del pNBC1 en la recuperación del pH_i tras una carga ácida en células ductulares pancreáticas estimuladas con forskolina de ratas normales y ratas con pancreatitis

En los experimentos de recuperación del pH_i tras una carga ácida descritos hasta el momento, en los que utilizamos EIPA para bloquear la actividad del NHE1, cabe la posibilidad de que parte de la recuperación, en principio atribuible al pNBC1, se deba en realidad a la actividad del intercambiador aniónico basolateral (AE) que, en estas condiciones, con los gradientes de concentración tan alterados, podría invertir su funcionamiento, permitiendo la entrada a la célula de HCO_3^- en intercambio por Cl^- , que saldría al medio extracelular. Este mecanismo podría enmascarar las eventuales alteraciones en la función del pNBC1. Así pues, en los siguientes experimentos de medida del pH_i en conductos pancreáticos de ratas normales y con pancreatitis, decidimos añadir bumetanida $30 \mu\text{M}$ al medio de perfusión. En estas condiciones, el bloqueo del cotransportador NKCC1 evitará la acumulación de Cl^- en la célula y, por lo tanto, la posibilidad de que el AE mantenga su funcionamiento inverso y colabore en la recuperación del pH_i .

Por otra parte, las alteraciones observadas en los experimentos de secreción de fluido dependiente de HCO_3^- aparecían tras su estimulación con forskolina. Ya hemos mencionado la posibilidad de que la capacidad secretora reducida, a través del pNBC1, sea atribuible a un defecto en algún mecanismo de activación de este cotransportador por la elevación en el cAMP; si este fuese el caso, ese defecto no se pondría de manifiesto en los experimentos de medida del pH_i descritos en el apartado anterior, realizados en ausencia de estimulación. Por

este motivo, además de añadir bumetanida, en los siguientes protocolos estimulamos los conductos, perfundiéndolos con forskolina 5 μM durante todo el experimento.

En los registros representativos del pH_i obtenidos en conductos pancreáticos aislados de ratas normales (Figura 72A) y con pancreatitis (Figura 72B) observamos que, en presencia de forskolina y bumetanida (situación control para estos experimentos) se produce una rápida recuperación del pH_i hasta valores cercanos a los iniciales.

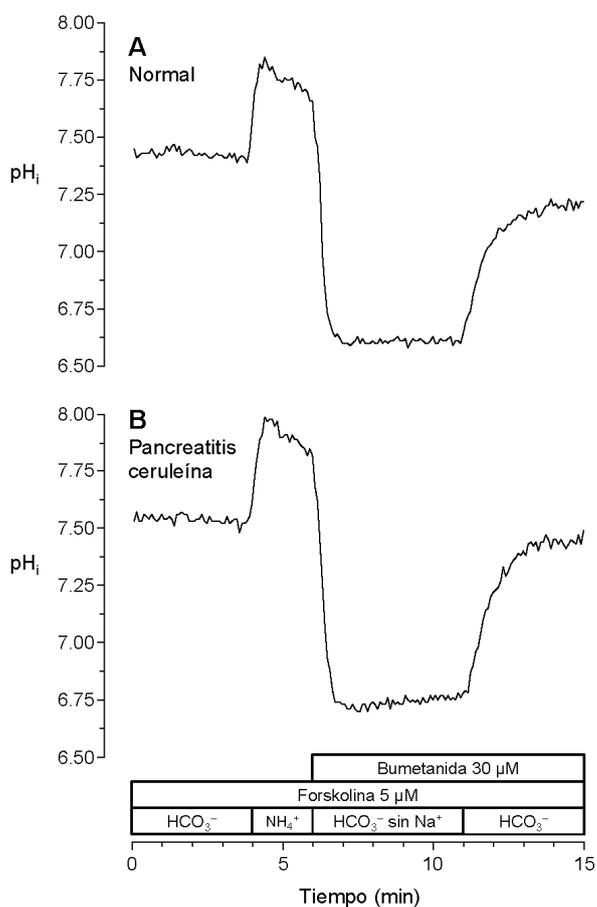


Figura 72. Efecto de la inhibición del cotransportador NKCC1 sobre la recuperación de una carga ácida en conductos estimulados con forskolina, aislados de ratas normales y de ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Registros de los cambios en el pH_i de un conducto de rata normal (A) y de un conducto de rata con pancreatitis (B), estimulados con forskolina 5 μM , tras un pulso de NH_4Cl y la perfusión en ausencia de Na^+ , en presencia de bumetanida 30 μM . Los registros son representativos de un total de 10 experimentos en ratas normales y 10 en ratas con pancreatitis.

En los registros representativos se observa que la recuperación del pH_i es menor cuando la perfusión se realiza en presencia de EIPA 3 μM que cuando los conductos se tratan con

bumetanida y forskolina en ausencia de este bloqueante (Figura 73). El efecto del EIPA sobre la recuperación del pH_i en estas condiciones experimentales se observa tanto en conductos de ratas normales como en los de ratas con pancreatitis.

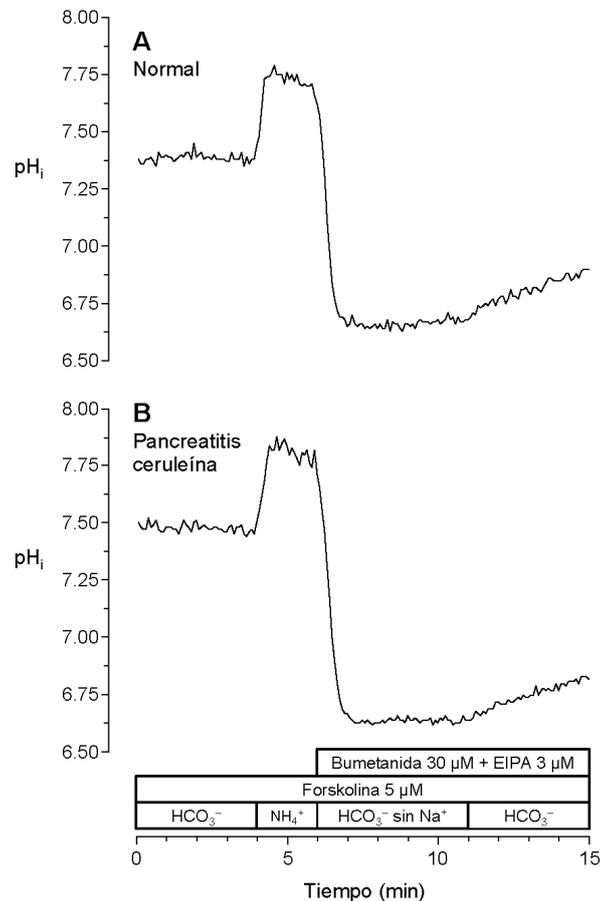


Figura 73. Efecto de la inhibición de los transportadores NKCC1 y NHE1 sobre la recuperación de una carga ácida en conductos estimulados con forskolina, aislados de ratas normales y de ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Registros de los cambios en el pH_i de un conducto de rata normal (A) y de un conducto de rata con pancreatitis (B), estimulados con forskolina 5 μM , tras un pulso de NH_4Cl y la perfusión en ausencia de Na^+ , en presencia de bumetanida 30 μM + EIPA 3 μM . Los registros son representativos de un total de 11 experimentos en ratas normales y 12 en ratas con pancreatitis.

En la Figura 74 se representa la velocidad de recuperación del pH_i (unidades de $\text{pH}\cdot\text{min}^{-1}$) en ratas normales y con pancreatitis, en situación control (conductos perfundidos con bumetanida y forskolina) y en presencia de EIPA (conductos perfundidos con bumetanida + EIPA y forskolina). Se observa que, en presencia de EIPA, la pendiente de la recuperación del pH_i es mucho menor que en su ausencia, tanto en los conductos de ratas normales como en los de

ratas con pancreatitis. El análisis estadístico de los resultados muestra que no existen diferencias significativas entre los dos grupos de animales.

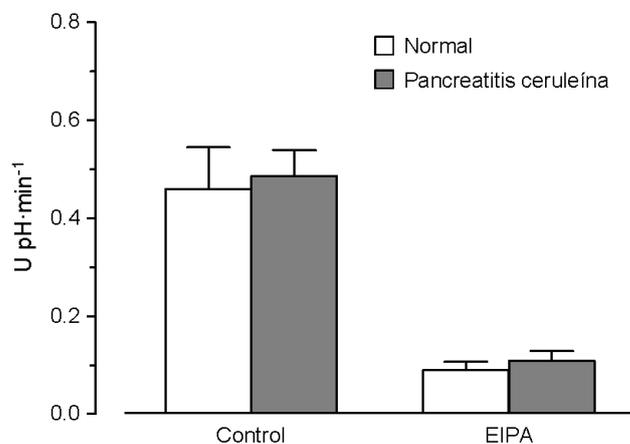


Figura 74. Efecto de la inhibición del intercambiador NHE1 sobre la velocidad de la recuperación del pH_i tras una carga ácida en conductos estimulados con forskolina, aislados de ratas normales y de ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína, en los que se mantiene bloqueado el cotransportador NKCC1. Los conductos de ratas normales (□) y con pancreatitis (■) fueron estimulados con forskolina $5 \mu\text{M}$ y la recuperación del pH_i se analizó en presencia de bumetanida $30 \mu\text{M}$ (control; □ $n=10$, ■ $n=10$) o en presencia de bumetanida $30 \mu\text{M}$ + EIPA $3 \mu\text{M}$ (EIPA; □ $n=11$, ■ $n=12$). Los valores se expresan como media \pm S.E.M. de la pendiente de recuperación del pH_i .

La presencia de bumetanida y forskolina no provocó ningún cambio significativo en la velocidad de recuperación del pH_i , en comparación con los datos obtenidos en ausencia de estas sustancias (Figura 71), ni en conductos de ratas normales ni en los de ratas con pancreatitis. Esto se observa tanto en los experimentos realizados en ausencia de EIPA como en su presencia. Estos resultados indican que la activación de los mecanismos secretores por la elevación del cAMP no acelera los procesos de salida de H^+ y/o entrada de HCO_3^- en respuesta a la acidificación del citosol. La falta de diferencias significativas entre las ratas normales y las pancreatíticas sugiere que cualquier tipo de regulación, por la vía del cAMP, de los transportadores implicados en estos procesos no estaría alterada como consecuencia de la pancreatitis. Por otra parte, el hecho de que la presencia de bumetanida tampoco afecte a la velocidad de recuperación del pH_i , en ninguno de los dos grupos de animales, parece indicar que el intercambiador aniónico basolateral (AE) no contribuye significativamente en estos procesos.

Finalmente, analizamos las unidades de pH no recuperadas, en presencia o ausencia de EIPA, al finalizar los experimentos (Figura 75). Se puede observar que las unidades de pH no recuperadas fueron mayores en presencia de EIPA que en situación control. Este efecto se observa tanto en los conductos del grupo de ratas normales como en los del grupo pancreatitis, no existiendo diferencias significativas entre ambos.

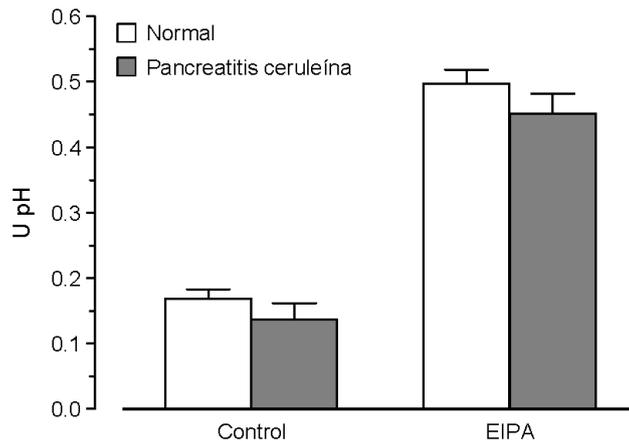


Figura 75. Efecto de la inhibición del intercambiador NHE1 sobre las unidades de pH no recuperadas tras una carga ácida en conductos estimulados con forskolina, aislados de ratas normales y de ratas con pancreatitis aguda inducida por ceruleína, en los que se mantiene bloqueado el cotransportador NKCC1. Los conductos de ratas normales (□) y con pancreatitis (■) fueron estimulados con forskolina 5 μ M y la recuperación del pH_i se analizó en presencia de bumetanida 30 μ M (control; □ n=10, ■ n=10) o en presencia de bumetanida 30 μ M + EIPA 3 μ M (EIPA; □ n=11, ■ n=12). Los valores se obtuvieron calculando la diferencia entre el pH_i al inicio y al final del experimento y se expresan como media \pm S.E.M.

Llama la atención que, en conductos de ratas normales perfundidos con forskolina y bumetanida, en ausencia de EIPA, la diferencia entre los valores medios iniciales y finales de pH_i sea de 0.168 ± 0.014 unidades. Esto contrasta con los resultados obtenidos en ausencia de estas sustancias (Figura 71), en los que la recuperación del pH_i era casi completa, con una diferencia de tan solo 0.019 ± 0.016 unidades de pH. Las diferencias entre estos valores son altamente significativas, de acuerdo con el test de la t de Student. La explicación de este resultado hay que buscarla en el hecho, ya mencionado, de que el tratamiento con forskolina induce una ligera y gradual acidificación en las células ductulares pancreáticas del ratón,²⁵⁵ y muy probablemente en las de la rata. Desde este punto de vista, el pH_i se recupera, pero no

llega a alcanzar los valores iniciales debido a la acción de la forskolina, que está presente en el medio de perfusión durante todo el experimento.

No observamos, en estas condiciones experimentales (presencia de forskolina y bumetanida), ninguna diferencia significativa entre las unidades de pH no recuperadas en los conductos procedentes de ratas normales y de ratas con pancreatitis inducida por ceruleína; esto es así tanto en ausencia de EIPA como en su presencia. En ausencia de EIPA, en los conductos de ratas pancreáticas, los valores finales de pH fueron muy similares a los que habíamos obtenido en ausencia de forskolina y bumetanida (Figura 71), es decir, así como en los conductos de ratas normales el tratamiento con forskolina evita la recuperación de los valores basales de pH_i , en los de ratas con pancreatitis se alcanzan los mismos valores que en conductos no estimulados. En los experimentos en conductos no estimulados, sugeríamos que esta falta de recuperación de los valores iniciales de pH_i en conductos de ratas con pancreatitis se debían a alguna alteración en el funcionamiento del pNBC1 en el rango fisiológico de pH_i ; en los resultados en conductos estimulados, esta posibilidad sigue siendo válida, aunque puede quedar enmascarada por el efecto de la forskolina. Al igual que sucedía en los conductos no estimulados perfundidos en presencia de EIPA, también en este caso el bloqueo del NHE1 impide la recuperación del pH_i hasta valores cercanos a los fisiológicos, no existiendo tampoco en este caso diferencias entre ratas normales y con pancreatitis. De nuevo, tenemos que pensar que a esos valores de pH_i no se manifiesta ningún tipo de alteración en la función del pNBC1, sin que podamos descartar que estas alteraciones influyan en su capacidad para transportar HCO_3^- hacia el citosol a valores de pH_i superiores a, aproximadamente, 7.3.

En definitiva, nuestros resultados de secreción de fluido en conductos de ratas con pancreatitis inducida por ceruleína mostraban una reducción significativa en la secreción dependiente de HCO_3^- mediada por la actividad del pNBC1. Los experimentos de análisis de los cambios en el pH_i nos permiten considerar que es muy improbable que exista una reducción en la cantidad de pNBC1 funcional en la membrana basolateral de las células ductulares de animales con esta patología. Por otra parte, los estudios en conductos estimulados permiten poner en duda que haya algún tipo de alteración en los hipotéticos mecanismos de activación de pNBC1 por el cAMP. Así pues, debemos centrarnos en nuestra tercera hipótesis, consistente

en algún efecto indirecto, mediado por cambios en el gradiente electroquímico a favor del cual funciona este cotransportador electrogénico.

El gradiente químico, es decir, la diferencia en la concentración de HCO_3^- a ambos lados de la membrana basolateral, no parece sufrir ningún tipo de cambio en los conductos de ratas con pancreatitis. La concentración de HCO_3^- en el medio de perfusión está fijada en 25 mM, y nuestros resultados indican que no existe ningún tipo de diferencia apreciable en los valores de pH_i entre células ductulares de ratas normales y ratas con pancreatitis, ni en situación de reposo ni tras la estimulación con forskolina.

El cotransportador pNBC1 es electrogénico, y su estequiometría es $1\text{Na}^+:2\text{HCO}_3^-$, es decir, el resultado neto de su actividad es la entrada a la célula de una carga negativa. De hecho, el pNBC1 es el único mecanismo electrogénico implicado en la acumulación de HCO_3^- en el interior de las células de los conductos. Esta característica del transportador implica que su actividad se verá favorecida por la despolarización de la membrana basolateral, fenómeno que se ha descrito en respuesta a la estimulación de las células ductulares con diversos agonistas, incluyendo la secretina.^{149,243,253} Así pues, planteamos como hipótesis que la menor secreción dependiente de HCO_3^- que observamos en los conductos de ratas con pancreatitis inducida por ceruleína puede ser una consecuencia indirecta de alteraciones en el potencial de membrana de las células ductulares pancreáticas, asociadas a esta patología y que, presumiblemente, implican una menor despolarización de la membrana basolateral en respuesta a estímulos que actúan por la vía del cAMP.

Sea cual sea el mecanismo responsable de estas alteraciones, lo cierto es que hemos comprobado que la pancreatitis inducida por ceruleína está asociada a una menor secreción de HCO_3^- en los conductos pancreáticos. De nuevo confirmamos que la funcionalidad de las células ductulares del páncreas exocrino de la rata está alterada como consecuencia de la pancreatitis aguda. Si estas alteraciones son una de las muchas consecuencias de esta enfermedad o están implicadas en sus mecanismos fisiopatológicos será objeto de futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

1. En las células ductulares pancreáticas de los ratones carentes de CFTR existe algún mecanismo de transporte epitelial capaz de mantener la secreción de HCO_3^- hacia el lumen de los conductos.
2. La secreción en respuesta al aumento de los niveles de cAMP en células ductulares del páncreas del ratón está mediada parcialmente por la proteína cinasa A, cuya acción no se ejerce únicamente sobre la proteína CFTR. Además, parte de los efectos del cAMP cursan por mecanismos independientes de la proteína cinasa A.
3. La activación por el cAMP de la ruta intracelular iniciada por su unión a las proteínas Epac potencia la respuesta secretora al carbacol, un agonista colinérgico, en conductos pancreáticos aislados del ratón.
4. El incremento en la concentración de cAMP, en las células ductulares pancreáticas de ratones carentes de CFTR, puede provocar la activación de una conductancia aniónica, cuyas características biofísicas no se corresponden con las de ninguno de los canales aniónicos identificados en este tipo celular.
5. La secreción enzimática de las células acinares pancreáticas de ratones carentes de CFTR está reducida, tanto en situación basal como tras la estimulación con secretagogos que actúan elevando el Ca^{2+} citosólico libre. Este efecto no depende de alteraciones en la homeostasis intracelular del Ca^{2+} .
6. La pancreatitis aguda inducida por L-arginina en la rata anula la capacidad secretora de los conductos pancreáticos.
7. La pancreatitis aguda inducida por la hiperestimulación con ceruleína en la rata altera la secreción ductular pancreática, reduciendo de manera selectiva la secreción dependiente de HCO_3^- ; este efecto está mediado por una menor entrada de este anión a la célula a través del cotransportador pNBC1 basolateral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Boorer K, Pushkin A, Kurtz I. Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem* 1998; 273: 17689-96.
2. Abuladze N, Song M, Pushkin A, Newman D, Lee I, Nicholas S, Kurtz I. Structural organization of the human NBC1 gene: kNBC1 is transcribed from an alternative promoter in intron 3. *Gene* 2000; 251: 109-22.
3. Adler G, Kern HF. The human exocrine pancreas in health and disease. En: Riva A & Motta PM, eds. *Ultrastructure of the Extraparietal Glands of the Digestive Tract*. Boston: Kluwer, 1990. Pags: 115-46.
4. Ahn W, Kim KH, Lee JA, Kim JY, Choi JY, Moe OW, Milgram SL, Muallem S, Lee MG. Regulatory interaction between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and HCO_3^- salvage mechanisms in model systems and the mouse pancreatic duct. *J Biol Chem* 2001; 276: 17236-43.
5. Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-6.
6. Aho HJ, Nevalainen TJ, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection. *Eur Surg Res* 1983; 15: 28-36.
7. Aleksandrov AA, Chang X, Aleksandrov L, Riordan JR. The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating. *J Physiol* 2000; 528: 259-65.
8. Ali AE, Ruthishauser SC, Case RM. Pancreatic and biliary secretion in the anesthetized Syrian golden hamster in response to secretin, cholecystokinin-octapeptide, bombesin, and carbachol. *Pancreas* 1990; 5: 314-22.
9. Al-Nakkash L, Cotton CU. Bovine pancreatic duct cells express cAMP- and Ca^{2+} -activated apical membrane Cl^- conductances. *Am J Physiol* 1997; 273: G204-16.
10. Alvarez C, Fasano A, Bass BL. Acute effects of bile acids on the pancreatic duct epithelium in vitro. *J Surg Res* 1998; 74: 43-6.
11. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1991; 253: 202-5.
12. Argent BE, Arkle S, Cullen MJ, Green R. Morphological, biochemical and secretory studies on rat pancreatic ducts maintained in tissue culture. *Q J Exp Physiol* 1986; 71: 633-48.
13. Argent BE. Cell physiology of pancreatic ducts. En: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Volume 2. 4th ed. San Diego: Elsevier, 2006. Pags: 1376-96.
14. Arkle S, Lee CM, Cullen MJ, Argent BE. Isolation of ducts from the pancreas of copper-deficient rats. *Q J Exp Physiol* 1986; 71: 249-65.
15. Aromataris EC, Roberts ML, Barritt GJ, Rychkov GY. Glucagon activates Ca^{2+} and Cl^- channels in rat hepatocytes. *J Physiol* 2006; 573: 611-25.
16. Ashizawa N, Watanabe M, Fukumoto S, Shimada Y. Scanning electron microscopic observations of three-dimensional structure of the rat pancreatic duct. *Pancreas* 1991; 6: 542-50.
17. Ashton N, Argent BE, Green R. Effect of vasoactive intestinal peptide, bombesin and substance P on fluid secretion by isolated rat pancreatic ducts. *J Physiol* 1990; 427: 471-82.
18. Ashton N, Argent BE, Green R. Characteristics of fluid secretion from isolated rat pancreatic ducts stimulated with secretin and bombesin. *J Physiol* 1991; 435: 533-46.
19. Ashton N, Evans RL, Elliott AC, Green R, Argent BE. Regulation of fluid secretion and intracellular messengers in isolated rat pancreatic ducts by acetylcholine. *J Physiol* 1993; 471: 549-62.

20. Bachmann O, Rossman H, Berger UV, Colledge WH, Ratcliff R. cAMP-mediated regulation of murine intestinal/pancreatic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter subtype pNBC1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G37-45.
21. Baron JH. The pancreas. *Mt Sinai J Med* 2000; 67: 68-75.
22. Barreto SG, Carati CJ, Schloithe AC, Toouli J, Saccone GT. Galanin potentiates supramaximal caerulein-stimulated pancreatic amylase secretion via its action on somatostatin secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G1268-73.
23. Barzilai A, Ryback BJ, Medina JA, Toth L, Dreiling DA. The morphological changes of the pancreas in hypovolemic shock and the effect of pretreatment with steroids. *Int J Pancreatol* 1987; 2: 23-32.
24. Becq F, Hollande E, Gola M. Phosphorylation-regulated low-conductance Cl⁻ channels in a human pancreatic duct cell line. *Pflügers Arch* 1993; 425: 1-8.
25. Berger HA, Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Howard PW, Maurer RA, Mulligan R, Smith AE, Welsh MJ. Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J Clin Invest* 1991; 88: 1422-31.
26. Bhandari M, Thomas AC, Hussey DJ, Li X, Jaya SP, Woods CM, Schloithe AC, Mayne GC, Carati CJ, Toouli J, Ormandy CJ, Saccone GT. Galanin mediates the pathogenesis of cerulein-induced acute pancreatitis in the mouse. *Pancreas* 2010; 39: 182-7.
27. Bloom W, Fawcett DW. Pancreas. En: Labor, ed. *Tratado de histología*. 1981. Pags: 728-44.
28. Borgese F, Sardet C, Cappadoro M, Pouyssegur J, Motais R. Cloning and expression of a cAMP-activated Na⁺/H⁺ exchanger: evidence that the cytoplasmic domain mediates hormonal regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6765-9.
29. Brodish RJ, Kuvshinoff BW, Fink AS, McFadden DW. Inhibition of pancreatic exocrine secretion by galanin. *Pancreas* 1994; 9: 297-303.
30. Brooke-Smith ME, Carati CJ, Bhandari M, Toouli J, Saccone GT. Galanin in the regulation of pancreatic vascular perfusion. *Pancreas* 2008; 36: 267-73.
31. Bro-Rasmussen F, Killmann SA, Thaysen JH. The composition of pancreatic juice as compared to sweat, parotid saliva and tears. *Acta Physiol Scand* 1956; 37: 97-113.
32. Bruce JIE, Yang XS, Ferguson CJ, Elliott AC, Steward MC, Case RM, Riccardi D. Molecular and functional identification of a Ca²⁺ (polyvalent cation)-sensing receptor in rat pancreas. *J Biol Chem* 1999; 274: 20561-8.
33. Buchler M, Friess H, Uhl W, Beger HG. Clinical relevance of experimental acute pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992; 24 Suppl 1: 85-8.
34. Bundgaard M, Moller M, Poulsen JH. Localization of sodium and potassium activated ATPase in the pancreas. *J Physiol* 1979; 295: 13P.
35. Burghardt B, Elkaer ML, Kwon TH, Racz GZ, Varga G, Steward MC, Nielsen S. Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut* 2003; 52: 1008-16.
36. Burghardt B, Nielsen S, Steward MC. The role of aquaporin water channels in fluid secretion by the exocrine pancreas. *J Membr Biol* 2006; 210: 143-53.
37. Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003; 83: 581-632.
38. Byrne JJ, Joison J. Bacterial regurgitation in experimental pancreatitis. *Am J Surg* 1964; 107: 317-20.
39. Caflisch CR, Solomon S, Galey WR. Exocrine ductal pCO₂ in the rabbit pancreas. *Pflügers Arch* 1979; 380: 121-5.

40. Cardone RA, Busco G, Greco MR, Bellizzi A, Accardi R, Cafarelli A, Monterisi S, Carratu P, Casavola V, Paradiso A, Tommasino M, Reshkin SJ. HPV16 E7-dependent transformation activates NHE1 through a PKA-RhoA-induced inhibition of p38alpha. *PLoS One* 2008; 3: e3529.
41. Case RM, Harper AA, Scratcherd T. Water and electrolyte secretion by the perfused pancreas of the cat. *J Physiol* 1968; 196: 133-49.
42. Case RM, Harper AA, Scratcherd T. The secretion of electrolytes and enzymes by the pancreas of the anaesthetized cat. *J Physiol* 1969; 201: 335-48.
43. Case RM, Scratcherd T. The secretion of alkali metal ions by the perfused cat pancreas as influenced by the composition and osmolality of the external environment and by inhibitors of metabolism and Na⁺,K⁺-ATPase activity. *J Physiol* 1974; 242: 415-28.
44. Case RM, Hotz J, Hutson D, Scratcherd T, Wynne RD. Electrolyte secretion by the isolated cat pancreas during replacement of extracellular bicarbonate by organic anions and chloride by inorganic anions. *J Physiol* 1979; 286: 563-76.
45. Case RM, Argent BE. Bicarbonate secretion by pancreatic duct cells: mechanisms and control. En: Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA & Scheele GA, eds. *The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology, and Diseases*. New York: Raven Press, 1986. Pags: 213-43.
46. Case RM, Argent BE. Pancreatic duct cell secretion: control and mechanisms of transport. En: Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA & Scheele GA, eds. *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1993. Pags: 304-50.
47. Case RM. Is the rat pancreas an appropriate model of the human pancreas? *Pancreatol* 2006; 6: 180-90.
48. Ceska M, Birath K, Brown B. A new and rapid method for the clinical determination of alpha-amylase activities in human serum and urine. Optimal conditions. *Clin Chim Acta* 1969; 26: 437-44.
49. Chaib N, Kabre E, Metioui M, Alzola E, Amsellem H, Marino A, Moran A, Dehaye JP. Activation of the Na⁺-K⁺ (NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter from rat submandibular glands in response to VIP. *Peptides* 1998; 19: 1759-70.
50. Chan HC, Cheung WT, Leung PY, Wu LJ, Cheng Chew SB, Ko WH, Wong PYD. Purinergic regulation of anion secretion by cystic fibrosis pancreatic duct cells. *Am J Physiol* 1996; 271: C469-77.
51. Chan HC, Law SH, Leung PS, Fu LXM, Wong PYD. Angiotensin II receptor type I-regulated anion secretion in cystic fibrosis pancreatic duct cells. *J Membr Biol* 1997; 156: 241-9.
52. Chan YC, Leung PS. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* 2007; 34: 1-14.
53. Chappe V, Hinkson DA, Zhu T, Chang X, Riordan JR, Hanrahan JW. Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J Physiol* 2003; 548: 39-52.
54. Chaudhuri A, Kolodecik TR, Gorelick FS. Effects of increased intracellular cAMP on carbachol-stimulated zymogen activation, secretion, and injury in the pancreatic acinar cell. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G235-43.
55. Chaudhuri A, Husain SZ, Kolodecik TR, Grant WM, Gorelick FS. Cyclic AMP-dependent protein kinase and Epac mediate cyclic AMP responses in pancreatic acini. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1403-10.
56. Chen X, Walker AK, Strahler JR, Simon ES, Tomanicek-Volk SL, Nelson BB, Hurley MC, Ernst SA, Williams JA, Andrews PC. Organellar proteomics: analysis of pancreatic zymogen granule membranes. *Mol Cell Proteom* 2006; 5: 306-12.
57. Cheng HS, Leung PY, Cheng Chew SB, Leung PS, Lam SY, Wong WS, Wang ZD, Chan HC. Concurrent and independent HCO₃⁻ and Cl⁻ secretion in a human pancreatic duct cell line (CAPAN-1). *J Membr Biol* 1998; 164: 155-67.

58. Chepurny OG, Leech CA, Kelley GG, Dzhura I, Dzhura E, Li X, Rindler MJ, Schwede F, Genieser HG, Holz GG. Enhanced Rap1 activation and insulin secretagogue properties of an acetoxymethyl ester of an Epac-selective cyclic AMP analog in rat INS-1 cells: studies with 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM. *J Biol Chem* 2009; 284: 10728-36.
59. Chetty U, Gilmour HM, Taylor TV. Experimental acute pancreatitis in the rat: a new model. *Gut* 1980; 21: 115-7.
60. Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 5267-72.
61. Chow BKC. Molecular cloning and functional characterization of a human secretin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212: 204-12.
62. Clark JS, Vandorpe DH, Chernova MN, Heneghan JF, Stewart AK, Alper SL. Species differences in Cl⁻ affinity and in electrogenicity of SLC26A6-mediated oxalate/Cl⁻ exchange correlate with the distinct human and mouse susceptibilities to nephrolithiasis. *J Physiol* 2008; 586: 1291-306.
63. Clarke LL, Grubb BR, Yankaskas JR, Cotton CU, McKenzie A, Boucher RC. Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in Cftr(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 479-83.
64. Colledge WH, Abella BS, Southern KW, Ratcliff R, Jiang C, Cheng SH, Macvnish LJ, Anderson JR, Cuthbert AW, Evans MJ. Generation and characterization of a ΔF508 cystic fibrosis mouse model. *Nature Genet* 1996; 10: 445-52.
65. Comline RS, Hall LW, Hickson JCD, Murillo A, Walker RG. Pancreatic secretion in the horse. *J Physiol* 1969; 204: 10-1.
66. Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC. Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9262-6.
67. Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, Smith CE. Guanylin: a endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992; 89: 947-51.
68. Czako L, Yamamoto M, Otsuki M. Pancreatic fluid hypersecretion in rats after acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 265-72.
69. Czako L, Yamamoto M, Otsuki M. Exocrine pancreatic function in rats after acute pancreatitis. *Pancreas* 1997; 15: 83-90.
70. Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, Lonovics J. Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1770-7.
71. Czako L, Takacs T, Varga IS, Hai DQ, Tiszlavicz L, Hegyi P, Mandi Y, Matkovics B, Lonovics J. The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis: inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin. *J Physiol Paris* 2000; 94: 43-50.
72. Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, Lonovics J. Oxidative stress in distant organs and the effects of allopurinol during experimental acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 2000; 27: 209-16.
73. Dabrowski A, Gabryelewicz A. Oxidative stress. An early phenomenon characteristic of acute experimental pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1992; 12: 193-9.
74. De Lisle RC, Isom KS, Ziemer D, Cotton CU. Changes in the exocrine pancreas secondary to altered small intestinal function in the CF mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G899-906.
75. De Ondarza J, Hootman SR. Confocal microscopic analysis of intracellular pH regulation in isolated guinea pig pancreatic ducts. *Am J Physiol* 1997; 272: G124-34.

76. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 1998; 396: 474-7.
77. Delaney SJ, Alton EW, Smith SN, Lunn DP, Farley, Lovelock PK, Thomson SA, Hume DA, Lamb D, Porteous DJ, Dorin JR, Wainwright BJ. Cystic fibrosis mice carrying the missense mutation G551D replicate human genotype-phenotype correlations. *EMBO J* 1996; 15: 955-63.
78. Domschke S, Domschke W, Rosch W, Konturek SJ, Wunsch E, Demling L. Bicarbonate and cyclic AMP content of pure human pancreatic juice in response to graded doses of synthetic secretin. *Gastroenterol* 1976; 70: 533-6.
79. Dorin JR, Dickinson P, Alton EW, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimber WL, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML. Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* 1992; 359: 211-5.
80. Dorwart MR, Shcheynikov N, Yang D, Muallem S. The solute carrier 26 family of proteins in epithelial ion transport. *Physiology* 2008; 23: 104-14.
81. Dreiling DA, Janowitz HD, Halpern M. The effect of a carbonic anhydrase inhibitor, Diamox, on human pancreatic secretion. Implications on the mechanism of pancreatic secretion. *Gastroenterol* 1968; 54: S765-7.
82. Durie PR, Forstner GG. Pathophysiology of the exocrine pancreas in cystic fibrosis. *J R Soc Med* 1989; 82: 2-10.
83. Eguiguren AL, Ríos J, Riveros N, Sepúlveda FV, Stutzin A. Calcium-activated chloride currents and non-selective cation channels in a novel cystic fibrosis-derived human pancreatic duct cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 505-13.
84. Elgavish A, Meezan E. Altered sulfate transport via anion exchange in CFPAC is corrected by retrovirus-mediated CFTR gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol* 1992; 263: C176-86.
85. Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL, Bos JL. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature Cell Biol* 2002; 4: 901-6.
86. Evans LAR, Young JA. The effect of transport blockers on pancreatic ductal secretion. *Proc Austral Physiol Pharmacol Soc* 1985; 16: 98P.
87. Evans LAR, Pirani D, Cook DI, Young JA. Intraepithelial current flow in rat pancreatic secretory epithelia. *Pflügers Arch* 1986; 407: S107-11.
88. Evans MG, Marty A. Calcium-dependent chloride currents in isolated cells from rat lacrimal glands. *J Physiol* 1986; 378: 437-60.
89. Evans RL, Ashton N, Elliott AC, Green R, Argent BE. Interactions between secretin and acetylcholine in the regulation of fluid secretion by isolated rat pancreatic ducts. *J Physiol* 1996; 496: 265-73.
90. Fernández-Salazar MP. Mecanismos de transporte iónico en la membrana basolateral de las células ductulares del páncreas: estudio en conductos aislados de rata y ratón. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. 2004.
91. Fernández-Salazar MP, Pascua P, Calvo JJ, López MA, Case RM, Steward MC, San Román JI. Basolateral anion transport mechanisms underlying fluid secretion by mouse, rat and guinea-pig pancreatic ducts. *J Physiol* 2004; 556: 415-28.
92. Fölsch UR, Fischer H, Söling H, Creutzfeldt W. Effects of gastrointestinal hormones and carbamylcholine on cAMP accumulation in isolated pancreatic duct fragments from the rat. *Digestion* 1980; 20: 277-92.
93. Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG. A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr(-/-)* mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13995-4000.

94. Freedman SD, Kern HF, Scheele GA. Pancreatic acinar cell disfunction in CFTR (-/-) mice is associated with impairments in luminal pH and endocytosis. *Gastroenterol* 2001; 121: 950-7.
95. Freiburghaus AU, Redha F, Ammann RW. Does acute pancreatitis progress to chronic pancreatitis? A microvascular pancreatitis model in the rat. *Pancreas* 1995; 11: 374-81.
96. Frick TW, Dalo S, O'Leary JF, Runge W, Borner JW, Baraniewski H, Dressel T, Shearen JG, Goodale RL. Effects of insecticide, diazinon, on pancreas of dog, cat and guinea pig. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1987; 7: 1-11.
97. Friess H, Weber A, Buchler M. Standards in monitoring acute experimental pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992; 24 Suppl 1: 1-13.
98. Furuya S, Naruse S, Ko SBH, Ishiguro H, Yoshikawa T, Hayakawa T. Distribution of aquaporin 1 in the rat pancreatic duct system examined with light- and electron-microscopic immunohistochemistry. *Cell Tissue Research* 2002; 308: 75-86.
99. Gadsby DC, Nairn AC. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev* 1999; 79: S77-107.
100. Garbers DL. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 1992; 71: 1-4.
101. García M, Hernández-Barbáchano E, Hernández-Lorenzo MP, San Román JI, López MA, Coveñas R, Calvo JJ. Saline infusion through the pancreatic duct leads to changes in calcium homeostasis similar to those observed in acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 300-8.
102. García M, Calvo JJ. Cardiocirculatory pathophysiological mechanisms in severe acute pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Therap* 2010; 1: 9-14.
103. Gardner JD, Jackson MJ. Regulation of amylase release from dispersed pancreatic acinar cells. *J Physiol* 1977; 270: 439-54.
104. Gaskin KJ, Durie P, Corey M, Wei P, Forstner GG. Evidence for a primary defect of pancreatic HCO₃⁻ secretion in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1982; 16: 554-7.
105. Gillen CM, Brill S, Payne JA, Forbush B. Molecular cloning and functional expression of the K⁺-Cl⁻ cotransporter from rabbit, rat, and human: a new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 1996; 271: 16237-44.
106. Glasbrenner B, Adler G. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Hepatogastroenterol* 1993; 40: 517-21.
107. Gorelick FS, Jamieson JD. The pancreatic acinar cell: structure-function relationship. En: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 3^o ed. New York: Raven Press, 1987. Pags: 1089-109.
108. Gorelick FS, Otani T. Mechanisms of intracellular zymogen activation. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999; 13: 227-40.
109. Grady T, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM, Gorelick FS. Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am J Physiol* 1998; 275: G1010-7.
110. Gray MA, Greenwell JR, Argent BE. Secretin-regulated chloride channel on the apical membrane of pancreatic duct cells. *J Membr Biol* 1988; 105: 131-42.
111. Gray MA, Harris A, Coleman L, Greenwell JR, Argent BE. Two types of chloride channel on duct cells cultured from human fetal pancreas. *Am J Physiol* 1989; 257: C240-51.
112. Gray MA, Argent BE. Non-selective cation channel on pancreatic duct cells. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1029: 33-42.
113. Gray MA, Greenwell JR, Garton AJ, Argent BE. Regulation of maxi-K⁺ channels on pancreatic duct cells by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *J Membr Biol* 1990; 115: 203-15.

114. Gray MA, Plant S, Argent BE. cAMP-regulated whole cell chloride currents in pancreatic duct cells. *Am J Physiol* 1993; 264: C591-602.
115. Gray MA, Winpenny JP, Porteous DJ, Dorin JR, Argent BE. CFTR and calcium-activated chloride currents in pancreatic duct cells of a transgenic CF mouse. *Am J Physiol* 1994; 266: C213-21.
116. Gray MA, O'Reilly C, Winpenny JP, Argent B. Functional interactions of HCO_3^- with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Pancreas* 2001; 2: 207-11.
117. Gray MA, Winpenny JP, Verdon B, O'Reilly CM, Argent BE. Properties and role of calcium-activated chloride channels in pancreatic duct cells. *Curr Topics Membr* 2002; 53: 231-56.
118. Greeley T, Shumaker H, Wang Z, Schweinfest CW, Soleimani M. Downregulated in adenoma and putative anion transporter are regulated by CFTR in cultured pancreatic duct cells. *Am J Physiol* 2001; 281: G1301-8.
119. Gress TM, Arnold R, Adler G. Structural alterations of pancreatic microvasculature in cerulein-induced pancreatitis in the rat. *Res Exp Med* 1990; 190: 401-12.
120. Gross E, Abuladze N, Pushkin A, Kurtz I, Cotton CU. The stoichiometry of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter pNBC1 in mouse pancreatic duct cells is $2\text{HCO}_3^-:1\text{Na}^+$. *J Physiol* 2001; 531: 375-82.
121. Gross E, Hawkins K, Pushkin A, Sassani P, Dukkipati R, Abuladze N, Hopfer U, Kurtz I. Phosphorylation of Ser982 in the sodium bicarbonate cotransporter kNBC1 shifts the $\text{HCO}_3^-:\text{Na}^+$ stoichiometry from 3:1 to 2:1 in murine proximal tubule cells. *J Physiol* 2001; 537: 659-65.
122. Grotmol T, Buanes T, Brors O, Ræder MG. Lack of effect of amiloride, furosemide, bumetanide and triamterene on pancreatic NaHCO_3 secretion in pigs. *Acta Physiol Scand* 1986; 126: 593-600.
123. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-50.
124. Guilbault C, Saeed Z, Downey GP, Radzioch D. Cystic fibrosis mouse models. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 1-7.
125. Haanes KA, Novak I. ATP storage and uptake by isolated pancreatic zymogen granules. *Biochem J* 2010; 429: 303-11.
126. Hadorn B, Johansen PG, Anderson CM. Pancreozymin secretin test of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis and the significance of the results for the pathogenesis of the disease. *Canad Med Association J* 1968; 98: 377-85.
127. Hamill OP, Neher ME, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981; 391: 85-100.
128. Hartzell HC, Qu Z, Yu K, Xiao Q, Chien LT. Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to Best disease and other retinopathies. *Physiol Rev* 2008; 88: 639-72.
129. Harvey MH, Wedgwood KR, Austin JA, Reber HA. Pancreatic duct pressure, duct permeability and acute pancreatitis. *Br J Surg* 1989; 76: 859-62.
130. Hasty P, O'Neal WK, Liu KQ, Morris AP, Bebok Z, Shumyatsky GB, Jilling T, Sorscher EJ, Bradley A, Beaudet AL. Severe phenotype in mice with termination mutation in exon 2 of cystic fibrosis gene. *Somat Cell Mol Genet* 1995; 21: 177-87.
131. He P, Klein J, Yun CC. Activation of Na^+/H^+ exchanger NHE3 by angiotensin II is mediated by inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) receptor-binding protein released with IP_3 (IRBIT) and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 2010; 285: 27869-78.
132. Hebert SC, Mount DB, Gamba G. Molecular physiology of cation-coupled Cl^- cotransport: the SLC12 family. *Pflügers Arch* 2004; 447: 580-93.

133. Hegyi P, Czako L, Takacs T, Szilvassy Z, Lonovics J. Pancreatic secretory responses in L-arginine-induced pancreatitis: comparison of diabetic and nondiabetic rats. *Pancreas* 1999; 19: 167-74.
134. Hegyi P, Gray MA, Argent BE. Substance P inhibits bicarbonate secretion from guinea pig pancreatic ducts by modulating an anion exchanger. *Am J Physiol* 2003; 285: C268-76.
135. Hegyi P, Rakonczay Z, Sari R, Gog C, Lonovics J, Takacs T, Czako L. L-arginine-induced experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2003-9.
136. Hegyi P, Venglovecz V, Pallagi P, Maleth J, Takacs T, Rakonczay Z. Galanin, a potent inhibitor of pancreatic bicarbonate secretion, is involved in the induction and progression of cerulein-induced experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2011; 40: 155-6.
137. Heitzmann D, Warth R. Physiology and pathophysiology of potassium channels in gastrointestinal epithelia. *Physiol Rev* 2008; 88: 1119-82.
138. Helms MN, Chen XJ, Ramosevac S, Eaton DC, Jain L. Dopamine regulation of amiloride-sensitive sodium channels in lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L710-22.
139. Hernández Lorenzo MP. Papel de la proteína cinasa A en la regulación de la secreción de agua y electrolitos en conductos pancreáticos aislados del ratón. Trabajo de Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca. 2006.
140. Hernández-Barbáchano E, San Román JI, López MA, Coveñas R, López-Novoa JM, Calvo JJ. Beneficial effects of vasodilators in preventing severe acute pancreatitis shock. *Pancreas* 2006; 32: 335-42.
141. Hirano T, Yotsumoto TM, Ando K, Tobe T. Changes of acinar cells in the pancreato-biliary duct ligation with exocrine pancreatic stimulation model in rats; protective effects of a new potent protease inhibitor, ONO3307. *Nihon Geka Hokan* 1991; 60: 342-53.
142. Hirano T, Manabe T, Steer M, Printz H, Calne R, Tobe T. Protective effects of therapy with a protease and xanthine oxidase inhibitor in short form pancreatic biliary obstruction and ischemia in rats. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176: 371-81.
143. Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L, Bhatia M, Lee HS, Frossard JL, Adler G, Steer ML. Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: G352-62.
144. Hogg RC, Wang Q, Large WA. Effects of Cl⁻ channel blockers on Ca²⁺-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 1333-41.
145. Hollander F, Birnbaum D. The role of carbonic anhydrase in pancreatic secretion. *Trans NY Acad Sci* 1952; 15: 56-8.
146. Holst JJ. Neural regulation of pancreatic exocrine function. En: Go VLW, DiMugno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA & Scheele GA, eds. *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1993. Pags: 287-300.
147. Hoque KM, Woodward OM, van Rossum DB, Zachos NC, Chen L, Leung GP, Guggino WB, Guggino SE, Tse CM. Epac1 mediates protein kinase A-independent mechanism of forskolin-activated intestinal chloride secretion. *J Gen Physiol* 2010; 135: 43-58.
148. Howell LD, Borchardt R, Kole J, Kaz AM, Randak C, Cohn JA. Protein kinase A regulates ATP hydrolysis and dimerization by a CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) domain. *Biochem J* 2004; 378: 151-9.
149. Hug M, Pahl C, Novak I. Effect of ATP, carbachol and other agonists on intracellular calcium activity and membrane voltage of pancreatic ducts. *Pflügers Arch* 1994; 426: 412-8.
150. Ignath I, Hegyi P, Venglovecz V, Szekely CA, Carr G, Hasegawa M, Inoue M, Takacs T, Argent BE, Gray MA, Rakonczay Z. CFTR expression but not Cl⁻ transport is involved in the stimulatory effect of bile acids on apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity in human pancreatic duct cells. *Pancreas* 2009; 38: 921-9.

151. Illek B, Tam AWK, Fischer H, Machen TE. Anion selectivity of apical membrane conductance of Calu 3 human airway epithelium. *Pflügers Arch* 1999; 437: 812-22.
152. Isenring P, Jacoby SC, Payne JA, Forbrush BI. Comparison of Na-K-Cl cotransporters. *J Biol Chem* 1988; 273: 11295-301.
153. Ishibashi K, Hara S, Kondo S. Aquaporin water channels in mammals. *Clin Exp Nephrol* 2009; 13: 107-17.
154. Ishiguro H, Steward MC, Lindsay ARG, Case RM. Accumulation of intracellular HCO_3^- by $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransport in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Physiol* 1996; 495: 169-78.
155. Ishiguro H, Steward MC, Wilson RW, Case RM. Bicarbonate secretion in interlobular ducts from guinea pig pancreas. *J Physiol* 1996; 495: 179-91.
156. Ishiguro H, Naruse S, Steward MC, Kitagawa M, Ko SBH, Hyakawa T, Case RM. Fluid secretion in interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J Physiol* 1998; 511: 407-22.
157. Ishiguro H, Naruse S, Kitagawa M, Hayakawa T, Case RM, Steward MC. Luminal ATP stimulates fluid and HCO_3^- secretion in guinea-pig pancreatic duct. *J Physiol* 1999; 591: 551-8.
158. Ishiguro H, Naruse S, Kitagawa M, Suzuki A, Yamamoto A, Hayakawa T, Case RM, Steward MC. CO_2 permeability and bicarbonate transport in microperfused interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J Physiol* 2000; 528: 305-15.
159. Ishiguro H, Naruse S, Kitagawa M, Mabuchi T, Kondo T, Hayakawa T, Case RM, Steward MC. Chloride transport in microperfused interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J Physiol* 2002; 539: 175-89.
160. Ishiguro H, Namkung W, Yamamoto A, Wang Z, Worrell RT, Xu J, Lee MG, Soleimani M. Effect of Slc26a6 deletion on apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger activity and cAMP-stimulated bicarbonate secretion in pancreatic duct. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G447-55.
161. Ishiguro H, Steward MC, Naruse S, Ko SBH, Goto H, Case RM, Kondo T, Yamamoto A. CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. *J Gen Physiol* 2009; 133: 315-26.
162. Iwatsuki K, Horiuchi A, Yonekura Y, Chiba S. Inhibitory effect of ouabain and acetazolamide on secretin-stimulated pancreatic exocrine secretion in anaesthetized dog. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1989; 16: 139-45.
163. Iwatsuki N, Kato K, Nishiyama A. The effects of gastrin and gastrin analogues on pancreatic acinar cell membrane potential and resistance. *Br J Pharmacol* 1977; 60: 147-54.
164. Jacob P, Christiani S, Rossmann H, Lamprecht G, Vieillard-Baron D, Muller R, Gregor M, Seidler U. Role of $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter NBC1, Na^+/H^+ exchanger NHE1, and carbonic anhydrase in rabbit duodenal bicarbonate secretion. *Gastroenterol* 2000; 119: 406-19.
165. Jaisser F, Beggah AT. The nongastric $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPases}$: molecular and functional properties. *Am J Physiol* 1999; 276: F812-24.
166. Jansen JWCM, De Pont JJHMM, Bonting SL. Transepithelial permeability in the rabbit pancreas. *Biochim Biophys Acta* 1979; 551: 95-108.
167. Jensen RT, Lemp GF, Gardner JD. Interaction of cholecystokinin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 2079-83.
168. Jo NS, London RM, Kim HD. Regulation of intestinal Cl^- and HCO_3^- secretion by uroguanylin. *Am J Physiol* 1998; 274: G633-44.
169. Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1995; 269: C1295-304.

170. Kandasamy RA, Yu FH, Harris R, Boucher A, Hanrahan JW, Orłowski J. Plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger isoforms (NHE-1, -2, and -3) are differentially responsive to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways. *J Biol Chem* 1995; 270: 29209-16.
171. Kang G, Joseph JW, Chepurny OG, Monaco M, Wheeler MB, Bos JL, Schwede F, Genieser HG, Holz GG. Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic β-cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 8279-85.
172. Kang G, Chepurny OG, Rindler MJ, Collis L, Chepurny Z, Li WH, Harbeck M, Roe MW, Holz GG. A cAMP and Ca²⁺ coincidence detector in support of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in mouse pancreatic β cells. *J Physiol* 2005; 566: 173-88.
173. Kang G, Chepurny OG, Malester B, Rindler MJ, Rehmann H, Bos JL, Schwede F, Coetzee WA, Holz GG. cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic β cells and rat INS-1 cells. *J Physiol* 2006; 573: 595-609.
174. Kanno T. Calcium-dependent amylase release and electrophysiological measurements in cells of the pancreas. *J Physiol* 1972; 226: 353-71.
175. Kanno T, Yamamoto M. 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* 1977; 264: 787-99.
176. Kaplan MR, Plotkin MD, Lee W, Xu Z, Lytton J, Hebert SC. Apical localization of the Na-K-2Cl cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs. *Kidney Int* 1996; 40: 40-7.
177. Kelley GG, Chepurny OG, Schwede F, Genieser HG, Leech CA, Roe MW, Li X, Dzhura I, Dzhura E, Afshari P, Holz GG. Glucose-dependent potentiation of mouse islet insulin secretion by Epac activator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM. *Islets* 2009; 1: 260-5.
178. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Marciewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui L. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-80.
179. Kidd JF, Thorn P. Intracellular Ca²⁺ and Cl⁻ channel activation in secretory cells. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 493-513.
180. Kirk KL, Halm DR, Dawson DC. Active sodium transport by turtle colon via an electrogenic Na-K exchange pump. *Nature* 1980; 287: 237-9.
181. Kishino Y, Kawamura S. Pancreatic damage induced by injecting a large dose of arginine. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1984; 47: 147-55.
182. Kishino Y, Takama S, Kitajima S. Ultracytochemistry of pancreatic damage induced by excess lysine. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1986; 52: 153-67.
183. Klar E, Messmer K, Warshaw AL, Herfarth C. Pancreatic ischaemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance and therapy. *Br J Surg* 1990; 77: 1205-10.
184. Klar E, Foitzik T, Buhr H, Messmer K, Herfarth C. Isovolemic hemodilution with dextran 60 as treatment of pancreatic ischemia in acute pancreatitis. Clinical practicability of an experimental concept. *Ann Surg* 1993; 217: 369-74.
185. Kloppel G, Maillet B. Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* 1993; 8: 659-70.
186. Ko SBH, Shcheynikov N, Choi JY, Luo X, Ishibashi K, Thomas PJ, Kim JY, Kim KH, Lee MG, Naruse S, Muallem S. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in cystic fibrosis. *EMBO J* 2002; 21: 5662-72.
187. Ko SBH, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Furuya S, Mizuno N, Wang Y, Yoshikawa T, Suzuki A, Shimano S, Hayakawa T. Aquaporins in rat pancreatic interlobular ducts. *Am J Physiol* 2002; 282: G324-31.

188. Ko SBH, Zeng W, Dorwart MR, Luo X, Kim KH, Millen L, Goto H, Naruse S, Soyombo A, Thomas PJ, Muallem S. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nature Cell Biol* 2004; 6: 343-50.
189. Koller BH, Smithies O. Altering genes in animals by gene targeting. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 705-30.
190. Kongsuphol P, Cassidy D, Hieke B, Treharne KJ, Schreiber R, Mehta A, Kunzelmann K. Mechanistic insight into control of CFTR by AMPK. *J Biol Chem* 2009; 284: 5645-53.
191. Kopelman H, Ferretti E, Gauthier C, Goodyer PR. Rabbit pancreatic acini express CFTR as a cAMP-activated chloride efflux pathway. *Am J Physiol* 1995; 269: C626-31.
192. Kopelman HR, Corey M, Gaskin KJ, Durie P, Forstner GG. Impaired chloride secretion, as well as bicarbonate secretion, underlies the fluid and secretory defect in the cystic fibrosis pancreas. *Gastroenterol* 1988; 98: 349-55.
193. Korn SJ, Horn R. Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording. *J Gen Physiol* 1989; 94: 789-812.
194. Kudari A, Wig JD, Vaiphei K, Kochhar R, Majumdar S, Gupta R, Yadav TD, Doley RP. Histopathological sequential changes in sodium taurocholate-induced acute pancreatitis. *J Pancreas* 2007; 8: 564-72.
195. Kuijpers GA, VanNooy IG, De Pont JJ, Bonting SL. The mechanism of fluid secretion in the rabbit pancreas studied by means of various inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1984; 778: 324-31.
196. Kulaksiz H, Cetin Y. Uroguanylin and guanylate cyclase C in the human pancreas: expression and mutuality of ligand/receptor localization as indicators of intercellular paracrine signaling pathways. *J Endocrinol* 2001; 170: 267-75.
197. Kulaksiz H, Schmid A, Hönscheid M, Eissele R, Klempnauer J, Cetin Y. Guanylin in the human pancreas: a novel luminocrine regulator pathway of electrolyte secretion via cGMP and CFTR in the ductal system. *Histochem Cell Biol* 2001; 115: 131-45.
198. Lagerlöf HO. *Pancreatic function and pancreatic disease studied by means of secretin*. Stockholm: P.A. Norstedt & Soner, 1942.
199. Lampel M, Kern HF. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1977; 373: 97-117.
200. Lankisch PG, Goke B, Folsch UR, Winckler K, Otto J, Creutzfeldt W. Influence of secretin on the course of acute experimental pancreatitis in rats. *Digestion* 1983; 26: 187-91.
201. Lebenthal E, Lerner A, Rolston DDK. The pancreas in cystic fibrosis. En: Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA & Scheele GA, eds. *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1993. Pags: 1041-81.
202. Lee HC. Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev* 1997; 77: 1133-64.
203. Lee JH, Richter W, Namkung W, Kim KH, Kim E, Conti M, Lee MG. Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors. *J Biol Chem* 2007; 282: 10414-22.
204. Lee MG, Choi JY, Luo X, Strickland E, Thomas PJ, Muallem S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. *J Biol Chem* 1999; 274: 14670-7.
205. Lee MG, Wigley WC, Zeng W, Noel LE, Marino CR, Thomas PJ, Muallem S. Regulation of Cl⁻/HCO₃⁻ exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 3414-21.

206. Lee MG, Ahn W, Choi JY, Luo X, Seo JT, Schultheis PJ, Shull GE, Kim KH, Muallem S. Na⁺-dependent transporters mediate HCO₃⁻ salvage across the luminal membrane of the main pancreatic duct. *J Clin Invest* 2000; 105: 1651-8.
207. Lee MG, Muallem S. Physiology of duct cell secretion. En: Beger HG, Warshaw AL, Büchler MW, Kozarek RA, Lerch MM, Neoptolemos JP, Shiratori K, Whitcomb DC & Rau BM, eds. *The Pancreas*. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd., 2008. Pags: 78-90.
208. Leonhardt U, Seidensticker F, Stockmann F, Creutzfeldt W. Effect of camostat administration for two weeks on experimental pancreatitis in mice and rats. *Pancreas* 1993; 8: 98-102.
209. Lerch MM, Saluja AK, Runzi M, Dawra R, Saluja M, Steer ML. Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum. *Gastroenterol* 1993; 104: 853-61.
210. Lerch MM, Weidenbach H, Gress TM, Adler G. Effect of kinin inhibition in experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1995; 269: G490-9.
211. Leung PS, Ip SP. Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1024-30.
212. Lichtenstein A, Milani R, Fernezlian SM, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA. Acute lung injury in two experimental models of acute pancreatitis: infusion of saline or sodium taurocholate into the pancreatic duct. *Crit Care Med* 2000; 28: 1497-502.
213. Lingard JM, Al-Nakkash L, Argent BE. Acetylcholine, ATP, bombesin, and cholecystokinin stimulate ¹²⁵I efflux from a human pancreatic adenocarcinoma cell line (BxPC-3). *Pancreas* 1994; 9: 599-605.
214. Lochner A, Moolman JA. The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev* 2006; 24: 261-74.
215. Lohi H, Kujala M, Kerkelä E, Sarialho-Kere U, Kestilä M, Kere J. Mapping of five new putative anion transporter genes in human and characterization of SLC26A6, a candidate gene for pancreatic anion exchanger. *Genomics* 2000; 70: 102-12.
216. Lohi H, Lamprecht G, Markovich D, Heil A, Kujala M. Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C769-79.
217. Loussouarn G, Demolombe S, Mohammad-Panah R. Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *Am J Physiol* 1996; 271: C1565-73.
218. Madden ME, Sarras MP. Distribution of Na⁺,K⁺-ATPase in rat exocrine pancreas as monitored by K⁺-NPPase cytochemistry and [³H]-ouabain binding: a plasma membrane protein found primarily to be ductal cell associated. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 1365-74.
219. Maleth J, Venglovecz V, Razga Z, Tiszlavicz L, Rakonczay Z, Hegyi P. Non-conjugated chenodeoxycholate induces severe mitochondrial damage and inhibits bicarbonate transport in pancreatic duct cells. *Gut* 2011; 60: 136-8.
220. Malinowska DH, Sachs G. Cellular mechanisms of acid secretion. *Clin Gastroenterol* 1984; 13: 309-26.
221. Mangos JA, McSherry NR. Micropuncture study of excretion of water and electrolytes by the pancreas. *Am J Physiol* 1971; 221: 496-503.
222. Mangos JA, McSherry NR, Nousia-Arvanitakis S, Irwin K. Secretion and transductal fluxes of ions in exocrine glands of the mouse. *Am J Physiol* 1973; 225: 18-24.
223. Manso MA, De Dios I, San Román JI, Calvo JJ, López MA. Effect of secretin on pancreatic juice proteins in caerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Peptides* 1989; 10: 255-60.
224. Manso MA, San Román JI, De Dios I, García LJ, López MA. Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. Study of pancreatic secretion and plasma VIP and secretin levels. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 364-8.

225. Marino CR, Matovcik LM, Gorelick FS, Cohn JA. Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreas. *J Clin Invest* 1991; 88: 712-6.
226. Marino CR, Jeanes V, Boron WF, Schmitt BM. Expression and distribution of the $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter in human pancreas. *Am J Physiol* 1999; 277: G487-94.
227. Marteau C, Silviani V, Ducroc R, Crotte C, Gerolami A. Evidence for apical Na^+/H^+ exchanger in bovine main pancreatic duct. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2336-40.
228. Meyerholz DK, Stoltz DA, Pezzulo AA, Welsh MJ. Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis. *Am J Pathol* 2010; 176: 1377-89.
229. Mizunuma T, Kawamura S, Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. *J Nutr* 1984; 114: 467-71.
230. Muallem S, Kwiatkowska K, Xu X, Yin HL. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol* 1995; 128: 589-98.
231. Namkung W, Lee JA, Ahn W, Han WS, Kwon SW, Ahn DS, Kim KH, Lee MG. Ca^{2+} activates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and Cl^- dependent HCO_3^- transport in pancreatic duct cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 200-7.
232. Nance FC, Cain JL. Studies of hemorrhagic pancreatitis in germ-free dogs. *Gastroenterol* 1968; 55: 368-74.
233. Nevalainen TJ, Seppa A. Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1975; 10: 521-7.
234. Nevalainen TJ. Phospholipase A2 in acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23: 897-904.
235. Ng SS, Pang RT, Chow BK, Cheng CH. Real-time evaluation of human secretin receptor activity using cytosensor microphysiometry. *J Cell Biochem* 1999; 72: 517-27.
236. Nguyen TD, Koh DS, Moody MW, Fox NR, Savard CE, Kuver R, Hille B, Lee SP. Characterization of two distinct chloride channels in cultured dog pancreatic duct epithelial cells. *Am J Physiol* 1997; 272: G172-80.
237. Nguyen TD, Okolo CN, Moody MW. Histamine stimulates ion transport by dog pancreatic duct epithelial cells through H_1 receptors. *Am J Physiol* 1998; 275: G76-84.
238. Niederau C, Luthen R, Niederau MC, Grendell JH, Ferrell LD. Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. Methodology and standards. *Eur Surg Res* 1992; 24 Suppl 1: 40-54.
239. Nishi T, Forgac M. The vacuolar H^+ -ATPases: nature's most versatile proton pumps. *Nature Rev* 2002; 3: 94-103.
240. Novak I, Greger R. Electrophysiological study of transport systems in isolated perfused pancreatic ducts: properties of the basolateral membrane. *Pflügers Arch* 1988; 411: 58-68.
241. Novak I, Greger R. Properties of the luminal membrane of isolated perfused rat pancreatic ducts: effect of cyclic AMP and blockers of chloride transport. *Pflügers Arch* 1988; 411: 546-53.
242. Novak I, Greger R. Effect of bicarbonate on potassium conductance of isolated perfused rat pancreatic ducts. *Pflügers Arch* 1991; 419: 76-83.
243. Novak I, Pahl C. Effect of secretin and inhibitors of $\text{HCO}_3^-/\text{H}^+$ transport on the membrane voltage of rat pancreatic duct cells. *Pflügers Arch* 1993; 425: 272-9.
244. Novak I, Wang J, Henriksen KL, Haanes KA, Krabbe S, Nitschke R, Hede SE. Pancreatic bicarbonate secretion involves two proton pumps. *J Biol Chem* 2011; 286: 280-9.

245. Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Giancippoli A, Carbone E. Exposure to cAMP and β -adrenergic stimulation recruits Ca_v3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J Physiol* 2004; 558: 433-49.
246. Ohana E, Yang D, Shcheynikov N, Muallem S. Diverse transport modes by the solute carrier 26 family of anion transporters. *J Physiol* 2009; 587: 2179-85.
247. Ohana E, Shcheynikov N, Yang D, So I, Muallem S. Determinants of coupled transport and uncoupled current by the electrogenic SLC26 transporters. *J Gen Physiol* 2011; 137: 239-51.
248. Ohtani O, Fujita T. Microcirculation of the pancreas with special reference to periductular circulation. A scanning electron microscope study of vascular casts. *Biomed Res* 1980; 1: 130-40.
249. O'Neal WK, Hasty P, McCray PB, Casey B, Rivera-Pérez J, Welsh MJ, Beaudet AL, Bradley A. A severe phenotype in mice with a duplication of exon 3 in the cystic fibrosis locus. *Human Molec Genet* 1993; 2: 1561-9.
250. O'Reilly CM, Winpenny JP, Argent BE, Gray MA. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator currents in guinea pig pancreatic duct cells: inhibition by bicarbonate ions. *Gastroenterol* 2000; 118: 1187-96.
251. Otsuki M, Tani S, Okabayashi Y, Fuji M, Nakamura T, Fujisawa T, Itoh H. Beneficial effects of the synthetic trypsin inhibitor camostatate in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 242-50.
252. Padfield PJ, Garner A, Case RM. Patterns of pancreatic secretion in the anaesthetised guinea pig following stimulation with secretin, cholecystokinin octapeptide, or bombesin. *Pancreas* 1989; 4: 204-9.
253. Pahl C, Novak I. Effect of vasoactive intestinal peptide, carbachol and other agonists on the membrane voltage of pancreatic duct cells. *Pflügers Arch* 1993; 424: 315-20.
254. Pascua P, Fernández-Salazar MP, Calvo JJ, Colledge WH, Case RM, Steward MC, San Román JI. Fluid secretion driven by Cl^- and HCO_3^- transport in ducts isolated from the pancreas of CFTR null mice. *Pancreatol* 2004; 4: 199.
255. Pascua P. Mecanismos de transporte iónico en células ductulares del páncreas de ratones con fibrosis quística. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. 2005.
256. Pascua P, García M, Fernández-Salazar MP, Hernández-Lorenzo MP, Calvo JJ, Colledge WH, Case RM, Steward MC, San Román JI. Ducts isolated from the pancreas of CFTR-null mice secrete fluid. *Pflügers Arch* 2009; 459: 203-14.
257. Peikin SR, Rottman AJ, Batzri S, Gardner JD. Kinetics of amylase release by dispersed acini prepared from guinea pig pancreas. *Am J Physiol* 1978; 235: 743-50.
258. Pestov NB, Korneenko TV, Shakhparonov MI, Shull GE, Modyanov NN. Loss of acidification of anterior prostate fluids in *Atp12a*-null mutant mice indicates that nongastric H-K-ATPase functions as proton pump in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291: C366-74.
259. Petersen OH, Ueda N. Secretion of fluid and amylase in the perfused rat pancreas. *J Physiol* 1977; 264: 819-35.
260. Petersen OH, Tepikin AV. Polarized calcium signaling in exocrine gland cells. *Annu Rev Physiol* 2008; 70: 273-99.
261. Pfeffer RB, Stasior O, Hinton JW. The clinical picture of the sequential development of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog. *Surg Forum* 1957; 8: 248-51.
262. Pfeffer RB, Lazzarini-Robertson A, Safadi D, Mixter G, Secoy CF, Hinton JW. Gradations of pancreatitis, edematous, through hemorrhagic, experimentally produced by controlled injection of microspheres into blood vessels in dogs. *Surgery* 1962; 51: 764-9.
263. Plant S, Gray MA, Argent BE. K^+ channels on pancreatic duct cells. *J Physiol* 1992; 452: 360P.

264. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 1992; 256: 385-7.
265. Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M. Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* 1991; 37: 15-26.
266. Ræder MG, Mathisen Ø. Effect of intravenous infusion of hypertonic glucose solutions on pancreatic HCO_3^- secretion. *Acta Physiol Scand* 1982; 115: 349-54.
267. Ræder MG. The origin and subcellular mechanisms causing pancreatic bicarbonate secretion. *Gastroenterol* 1992; 103: 1674-84.
268. Randak C, Welsh MJ. An intrinsic adenylate kinase activity regulates gating of the ABC transporter CFTR. *Cell* 2003; 115: 837-50.
269. Ratcliff R, Evans MJ, Cuthbert AW, MacVinish LJ, Foster D, Anderson JR, Colledge WH. Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting. *Nature Genet* 1993; 4: 35-41.
270. Reddy MM, Quinton PM. Control of dynamic CFTR selectivity by glutamate and ATP in epithelial cells. *Nature* 2003; 423: 756-60.
271. Reed RR. Signaling pathways in odorant detection. *Neuron* 1992; 8: 205-9.
272. Renner IG, Wisner JR, Rinderknecht H. Protective effects of exogenous secretin on ceruletide-induced acute pancreatitis in the rat. *J Clin Invest* 1983; 72: 1081-92.
273. Ridderstap AS, Bonting SL. Na^+ - K^+ activated ATPase and exocrine pancreatic secretion in vitro. *Am J Physiol* 1969; 217: 1721-7.
274. Rink TJ, Tsien RY, Pozzan T. Cytoplasmic pH and free Mg^{2+} in lymphocytes. *J Cell Biol* 1982; 95: 189-96.
275. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73.
276. Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB, Zabner J, Prather RS, Welsh MJ. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 2008; 321: 1837-41.
277. Romero MF, Fulton CM, Boron WF. The SLC4 family of HCO_3^- transporters. *Pflügers Arch* 2004; 447: 495-509.
278. Rosen HR, Tuchler H. Pulmonary injury in acute experimental pancreatitis correlates with elevated levels of free fatty acids in rats. *HPB Surg* 1992; 6: 79-90.
279. Rosenstein BJ, Zeitlin PL. Cystic fibrosis. *Lancet* 1998; 351: 277-82.
280. Rothman SS, Brooks FP. Electrolyte secretion from rabbit pancreas in vitro. *Am J Physiol* 1965; 208: 1171-6.
281. Roussa E, Alper SL, Thévenod F. Immunolocalization of anion exchanger AE2, Na^+/H^+ exchangers NHE1 and NHE4, and vacuolar type H^+ -ATPase in rat pancreas. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 463-74.
282. Roussa E, Shmukler BE, Wilhelm S, Casula S, Stuart-Tilley AK, Thévenod F, Alper SL. Immunolocalization of potassium-chloride cotransporter polypeptides in rat exocrine glands. *Histochem Cell Biol* 2002; 117: 335-44.
283. Sabbatini ME, Chen X, Ernst SA, Williams JA. Rap1 activation plays a regulatory role in pancreatic amylase secretion. *J Biol Chem* 2008; 283: 23884-94.
284. Saharia P, Margolis S, Zuidema GD, Cameron JL. Acute pancreatitis with hyperlipemia: studies with an isolated perfused canine pancreas. *Surgery* 1977; 82: 60-7.

285. Saluja AK, Saito I, Saluja M, Houlihan MJ, Powers RE, Meldolesi J, Steer M. In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. *Am J Physiol* 1985; 249: G702-10.
286. Saluja AK, Lerch MM, Phillips PA, Dudeja V. Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? *Annu Rev Physiol* 2007; 69: 249-69.
287. San Román JI, Case RM, Steward MC. Fluid secretion by isolated murine pancreatic ducts in the presence and absence of extracellular bicarbonate. *J Physiol* 1998; 513: 53P-4P.
288. San Román JI, Colledge WH, Evans MJ, Case RM, Steward MC. Fluid secretion in ducts isolated from the pancreas of CFTR null (-/-) mice. *J Physiol* 1999; 517: 24P.
289. Sarles H, Adler G, Dani R, Frey C, Gullo L, Harada H, Martin E, Norohna M, Scuro LA. The pancreatitis classification of Marseilles-Rome 1988. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 641-2.
290. Sato S, Stark HA, Martínez J, Beaven MA, Jensen RT, Gardner JD. Receptor occupation, calcium mobilization, and amylase release in pancreatic acini: effect of CCK-JMV-180. *Am J Physiol* 1989; 257: G202-9.
291. Satoh H, Moriyama N, Hara C, Yamada H, Horita S, Kunimi M, Tsukamoto K, Iso-O N, Inatomi J, Kawakami H, Kudo A, Endou H, Igarashi T, Goto A, Fujita T, Seki G. Localization of Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter (NBC-1) variants in rat and human pancreas. *Am J Physiol* 2003; 284: C729-37.
292. Scheele GA, Fukuoka S, Kern HF, Freedman SD. Pancreatic dysfunction in cystic fibrosis occurs as a result of impairments in luminal pH, apical trafficking of zymogen granule membranes, and solubilization of secretory enzymes. *Pancreas* 1996; 12: 1-9.
293. Schmidhuber SM, Starr A, Wynick D, Kofler B, Brain SD. Targeted disruption of the galanin gene attenuates inflammatory responses in murine skin. *J Mol Neurosci* 2008; 34: 149-55.
294. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56.
295. Schmidt M, Evellin S, Weernink PA, von Dorp F, Rehmann H, Lomasney JW, Jakobs KH. A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nature Cell Biol* 2001; 3: 1020-4.
296. Schoenberg MH, Buchler M, Younes M, Kirchmayr R, Bruckner UB, Beger HG. Effect of antioxidant treatment in rats with acute hemorrhagic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 1034-40.
297. Schoumacher RA, Ram J, Iannuzzi MC, Bradbury NA, Wallace RW, Hon CT, Kelly DR, Schmid SM, Gelder FB, Rado TA. A cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4012-6.
298. Schreiber R, Uliyakina I, Kongsuphol P, Warth R, Mirza M, Martins JR, Kunzelmann K. Expression and function of epithelial anoctamins. *J Biol Chem* 2010; 285: 7838-45.
299. Schulz I, Yamagata A, Weske M. Micropuncture studies on the pancreas of the rabbit. *Pflügers Arch* 1969; 308: 277-90.
300. Schulz I. Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas. En: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, 1981. Pags: 795-818.
301. Seamon KB, Padgett W, Daly JW. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3363-7.
302. Seow KTF, Case RM, Young JA. Pancreatic secretion by the anaesthetized rabbit in response to secretin, cholecystokinin, and carbachol. *Pancreas* 1991; 6: 385-91.
303. Sewell WA, Young JA. Secretion of electrolytes by the pancreas of the anaesthetized rat. *J Physiol* 1975; 252: 379-96.
304. Shah AU, Grant WM, Latif SU, Mannan ZM, Park AJ, Husain SZ. Cyclic AMP accelerates calcium waves in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G1328-34.

305. Shanmugam MK, Bhatia M. The role of pro-inflammatory molecules and pharmacological agents in acute pancreatitis and sepsis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010; 9: 20-31.
306. Shcheynikov N, Kim KH, Kim KM, Dorwart MR, Ko SBH. Dynamic control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ selectivity by external Cl^- . *J Biol Chem* 2004; 279: 21857-65.
307. Shcheynikov N, Wang Y, Park M, Ko SB, Dorwart M, Naruse S, Thomas PJ, Muallem S. Coupling modes and stoichiometry of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by *slc26a3* and *slc26a6*. *J Gen Physiol* 2006; 127: 511-24.
308. Shibata T, Hibino H, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y. Gastric type H^+/K^+ -ATPase in the cochlear lateral wall is critically involved in formation of the endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291: C1038-48.
309. Shibayama Y. Pancreatic venous stasis and endotoxaemia as aetiologic factors in acute haemorrhagic pancreatitis. *J Pathol* 1987; 152: 177-82.
310. Shirakabe K, Priori G, Yamada H, Ando H, Horita S, Fujita T, Fujimoto I, Mizutani A, Seki G, Mikoshiba K. IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter 1 (pNBC1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 9542-7.
311. Shumaker H, Amlal H, Frizzell R, Ulrich CD, Soleimani M. CFTR drives $\text{Na}^+/\text{nHCO}_3^-$ cotransport in pancreatic duct cells: a basis for defective HCO_3^- secretion in CF. *Am J Physiol* 1999; 276: C16-25.
312. Shumaker H, Soleimani M. CFTR upregulates the expression of the basolateral $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter in cultured pancreatic duct cells. *Am J Physiol* 1999; 277: C1100-10.
313. Silver RB, Soleimani M. H^+/K^+ -ATPases: regulation and role in pathophysiological states. *Am J Physiol* 1999; 276: F799-811.
314. Singer MV, Gyr K, Sarles H. Revised classification of pancreatitis. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984. *Gastroenterol* 1985; 89: 683-5.
315. Singh AK, Riederer B, Krabbenhoft A, Rausch B, Bonhagen J, Lehmann U, de Jonge HR, Donowitz M, Yun C, Weinman EJ, Kocher O, Hogema BM, Seidler U. Differential roles of NHERF1, NHERF2, and PDZK1 in regulating CFTR-mediated intestinal anion secretion in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 540-50.
316. Singh M. Role of cyclic adenosine monophosphate in amylase release from dissociated rat pancreatic acini. *J Physiol* 1982; 331: 547-55.
317. Singh VP, Saluja AK, Bhagat L, van Acker GJ, Song AM, Soltoff SP, Cantley LC, Steer ML. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of trypsinogen modulates the severity of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1387-95.
318. Skelin M, Rupnik M. cAMP increases the sensitivity of exocytosis to Ca^{2+} primarily through protein kinase A in mouse pancreatic beta cells. *Cell Calcium* 2011; 49: 89-99.
319. Sledzinski Z, Wozniak M, Brunelli A, Lezoche E, Scutti G, Kossowska E, Jankowski K, Stanek A, Bertoli E. Experimental pancreatitis induced by synthetic prooxidant tert-butyl hydroperoxide. *Pancreas* 2000; 20: 146-51.
320. Smith ZD, Caplan MJ, Forbush B, Jamieson JD. Monoclonal antibody localization of Na^+/K^+ -ATPase in the exocrine pancreas and parotid of the dog. *Am J Physiol* 1987; 253: G99-109.
321. Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Moalouf NN, Boucher RC, Smithies O, Koller BH. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* 1992; 257: 1083-8.
322. Sohma Y, Gray MA, Imai Y, Argent BE. A mathematical model of the pancreatic ductal epithelium. *J Membr Biol* 1996; 154: 53-67.
323. Sohma Y, Gray MA, Imai Y, Argent BE. HCO_3^- transport in a mathematical model of the pancreatic ductal epithelium. *J Membr Biol* 2000; 176: 77-100.

324. Spicer SS, Sens MA, Tashian RE. Immunocytochemical demonstration of carbonic anhydrase in human epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 864-73.
325. Steward MC, Lang TF, San Román JI, Case RM. Measurement of secretory rate in isolated pancreatic duct segments by digital videomicroscopy. *J Physiol* 1998; 509: 3P.
326. Steward MC, Lang TF, Yang XS, San Román JI, Varga G, Case RM. Regulation of HCO_3^- and fluid secretion in isolated guinea-pig pancreatic ducts. *J Physiol* 1998; 511: 23P-4P.
327. Steward MC, Ishiguro H, Case RM. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 377-409.
328. Steward MC, Ishiguro H. Molecular and cellular regulation of pancreatic duct cell function. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 447-53.
329. Stewart AK, Yamamoto A, Nakakuki M, Kondo T, Alper SL, Ishiguro H. Functional coupling of apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange with CFTR in stimulated HCO_3^- secretion by guinea pig interlobular pancreatic duct. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1307-17.
330. Stewart AK, Shmukler BE, Vandorpe DH, Reimold F, Heneghan JF, Nakakuki M, Akhvein A, Ko S, Ishiguro H, Alper SL. SLC26 anion exchangers of guinea pig pancreatic duct: molecular cloning and functional characterization. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301: C289-303.
331. Stuenkel EL, Machen TE, Williams JA. pH regulatory mechanisms in rat pancreatic ductal cells. *Am J Physiol* 1988; 254: G925-30.
332. Stuenkel EL, Hootman SR. Secretagogue effects on intracellular calcium in pancreatic duct cells. *Pflügers Arch* 1990; 416: 652-8.
333. Sturgess JM. Structural and developmental abnormalities of the exocrine pancreas in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3 Suppl 1: S55-66.
334. Sun Park W, Kyoung Son Y, Kim N, Boum Youm J, Joo H, Warda M, Ko JH, Earm YE, Han J. The protein kinase A inhibitor, H-89, directly inhibits K_{ATP} and Kir channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 1104-10.
335. Swanson CH, Solomon AK. A micropuncture investigation of the whole tissue mechanism of electrolyte secretion by the in vitro rabbit pancreas. *J Gen Physiol* 1973; 62: 407-29.
336. Swanson CH, Solomon AK. Micropuncture analysis of the cellular mechanisms of electrolyte secretion by the in vitro rabbit pancreas. *J Gen Physiol* 1975; 65: 22-45.
337. Szalmai G, Varga G, Kajiyama F, Yang XS, Lang TF, Case RM, Steward MC. Bicarbonate and fluid secretion evoked by cholecystokinin, bombesin and acetylcholine in isolated guinea-pig pancreatic ducts. *J Physiol* 2001; 535: 795-807.
338. Takacs T, Hegyi P, Czako L, Balaspiri L, Lonovics J. Effects of galanin(1-16) on pancreatic secretion in anesthetized and conscious rats. *Res Exp Med* 2000; 199: 275-83.
339. Takacs T, Czako L, Morschl E, Laszlo F, Tizslavicz L, Rakonczay Z, Lonovics J. The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25: 277-82.
340. Takahashi-Iwanaga H, Yanase H, Oriyasa M. Reexamination of the fine structure of the pancreatic duct system in the rat: a proposal of morphological segmentation. *Biomed Res* 2003; 24: 77-87.
341. Tang L, Fatehi M, Linsdell P. Mechanism of direct bicarbonate transport by the CFTR anion channel. *J Cyst Fibros* 2009; 8: 115-21.
342. Tang S, Beharry S, Kent G, Durie PR. Synergistic effects of cAMP- and calcium-mediated amylase secretion in isolated pancreatic acini from cystic fibrosis mice. *Pediatr Res* 1999; 45: 482-8.

343. Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, Nakamura T, Fujii M, Fujisawa T, Koide M, Otsuki M. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 367-74.
344. Tashiro M, Schafer C, Yao H, Ernst SA, Williams JA. Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells. *Gut* 2001; 49: 241-50.
345. Thernouth J, Buttle HL. Concurrent studies on the flow of digesta in the duodenum and of exocrine pancreatic secretion of calves. The collection of the exocrine pancreatic secretion from a duodenal cannula. *Br J Nutr* 1973; 29: 387-97.
346. Thévenod F, Roussa E, Schmitt BM, Romero MF. Cloning and immunolocalization of a rat pancreatic Na⁺ bicarbonate cotransporter. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 291-8.
347. Thomas JA, Buchbaum RN, Zimniak A, Racker E. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* 1979; 18: 2210-8.
348. Thorn P, Lawrie AM, Smith PM, Gallacher DV, Petersen OH. Ca²⁺ oscillations in pancreatic acinar cells: spatiotemporal relationships and functional implications. *Cell Calcium* 1993; 14: 746-57.
349. Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R, Working Party of the Program Committee of the Bangkok World Congress of Gastroenterology 2002. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S15-39.
350. Ulrich CD, Holtmann M, Miller LJ. Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors. *Gastroenterol* 1998; 114: 382-97.
351. Ulrich CD, Wood P, Hadac EM, Kopras E, Whitcomb DC, Miller LJ. Cellular distribution of secretin receptor expression in rat pancreas. *Am J Physiol* 1998; 275: G1437-44.
352. Unal E, Uzun H, Kusaslan R, Dogan M, Genc H, Gunes P, Titiz I. Serum paraoxonase (a high-density lipoprotein-associated lipophilic antioxidant) activity and lipid profile in experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2005; 31: 84-7.
353. Van Doorninck JH, French PJ, Verbeek E, Peters RH, Morreau H, Bijman J, Scholte BJ. A mouse model for the cystic fibrosis $\Delta F508$ mutation. *EMBO J* 1995; 14: 4403-11.
354. van Ooijen B, Tinga CJ, Kort WJ, Zijlstra FJ, Lamberts SW, Wilson JH. Effects of long-acting somatostatin analog (SMS 201-995) on eicosanoid synthesis and survival in rats with acute necrotizing pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1434-40.
355. Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1197-208.
356. Veel T, Villanger O, Holthe MR, Cragoe EJ, Ræder MG. Na⁺-H⁺ exchange is not important for pancreatic HCO₃⁻ secretion in the pig. *Acta Physiol Scand* 1992; 144: 239-46.
357. Veel T, Buanes T, Grotmol T, Engeland E, Ræder MG. Colchicine blocks the effects of secretin on bile duct cell tubulovesicles and plasma membrane geometry and impairs ductular HCO₃⁻ secretion in the pig. *Acta Physiol Scand* 1990; 139: 603-7.
358. Veel T, Buanes T, Grotmol T, Østensen J, Ræder MG. Secretin dissipates red acridine orange fluorescence from pancreatic duct epithelium. *Acta Physiol Scand* 1991; 141: 221-6.
359. Venglovecz V, Rakonczay Z, Ozsvari B, Takacs T, Lonovics J, Varro A, Gray MA, Argent BE, Hegyi P. Effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig. *Gut* 2008; 57: 1102-12.
360. Venglovecz V, Hegyi P, Rakonczay Z, Tiszlavicz L, Nardi A, Grunnet M, Gray MA. Pathophysiological relevance of apical large-conductance Ca²⁺-activated potassium channels in pancreatic duct epithelial cells. *Gut* 2011; 60: 361-9.

361. Verdon B, Winpenny JP, Whitfield KJ, Argent BE, Gray MA. Volume-activated chloride currents in pancreatic duct cells. *J Membr Biol* 1995; 147: 173-83.
362. Villanger O, Veel T, Ræder MG. Secretin causes H⁺/HCO₃⁻ secretion from pig pancreatic ductules by vacuolar-type H⁺-adenosine triphosphatase. *Gastroenterol* 1995; 108: 850-9.
363. Vliem MJ, Ponsioen B, Schwede F, Pannekoek WJ, Riedl J, Kooistra MR, Jalink K, Genieser HG, Bos JL, Rehmann H. 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM: an improved Epac-selective cAMP analogue. *Chembiochem* 2008; 9: 2052-4.
364. Voronina SG, Barrow SL, Simpson AW, Gerasimenko OV, da Silva Xavier G, Rutter GA, Petersen OH, Tepikin AV. Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells. *Gastroenterol* 2010; 138: 1976-87.
365. Wakui M, Osipchuk YV, Petersen OH. Receptor-activated cytoplasmic Ca²⁺ spiking mediated by inositol trisphosphate is due to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *Cell* 1990; 63: 1025-32.
366. Walker NM, Simpson JE, Levitt RC, Boyle KT, Clarke LL. Talniflumate increases survival in a cystic fibrosis mouse model of distal intestinal obstructive syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317: 275-83.
367. Warth R, Greger R. The ion conductances of CFPAC-1 cells. *Cell Physiol Biochem* 1993; 3: 2-16.
368. Watanabe O, Baccino FM, Steer ML, Meldolesi J. Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Am J Physiol* 1984; 246: G457-67.
369. Weber A, Friess H, Sill U, Buchler M. The closed duodenal loop technique. *Eur Surg Res* 1992; 24 Suppl 1: 24-8.
370. Widdison AL, Alvarez C, Reber HA. The low-pressure duct perfusion model of acute pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992; 24 Suppl 1: 55-61.
371. Willemer S, Elsasser HP, Adler G. Hormone-induced pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992; 24 Suppl 1: 29-39.
372. Williams JA, Groblewski GE, Ohnishi H, Yule DI. Stimulus-secretion coupling of pancreatic digestive enzyme secretion. *Digestion* 1997; 58 Suppl 1: 42-5.
373. Williams JA. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 77-97.
374. Williams JA, Chen X, Sabbatini ME. Small G proteins as key regulators of pancreatic digestive enzyme secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E405-14.
375. Winpenny JP, Verdon B, McAlroy HL, Colledge WH, Ratcliff R, Evans MJ, Gray MA, Argent BE. Calcium-activated chloride conductance is not increased in pancreatic duct cells of CF mice. *Pflügers Arch* 1995; 430: 26-33.
376. Winpenny JP, Harris A, Hollingsworth MA, Argent BE, Gray MA. Calcium-activated chloride conductance in a pancreatic adenocarcinoma cell line of ductal origin (HPAF) and in freshly isolated human pancreatic duct cells. *Pflügers Arch* 1998; 435: 796-803.
377. Witzmann V, Schulz I. Influence of amphotericin, amiloride, ionophores, and 2,4-dinitrophenol on the secretion of the isolated cat's pancreas. *Pflügers Arch* 1973; 339: 317-38.
378. Yang D, Shcheynikov N, Zeng W, Ohana E, So I, Ando H, Mizutani A, Mikoshiba K, Muallem S. IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO₃⁻ secretion by stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct. *J Clin Invest* 2009; 119: 193-202.
379. Yang D, Shcheynikov N, Muallem S. IRBIT: it is everywhere. *Neurochem Res* 2011; 36: 1166-74.
380. Yang H, Wang Z, Miyamoto Y, Reinach PS. Cell signaling pathways mediating epidermal growth factor stimulation of Na:K:2Cl cotransport activity in rabbit corneal epithelial cells. *J Membr Biol* 2001; 183: 93-101.

-
381. Yao X, Forte JG. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 103-31.
382. Yip KP. Epac-mediated Ca^{2+} mobilization and exocytosis in inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291: F882-90.
383. Yoshinaga K, Washizuka M, Segawa Y. Cholecystokinin acts as an essential factor in the exacerbation of pancreatic bile duct ligation-induced rat pancreatitis model under non-fasting condition. *Jpn J Pharmacol* 2000; 84: 44-50.
384. Zeng W, Lee MG, Yan M, Diaz J, Benjamin I, Marino CR, Kopito R, Freedman S, Cotton C, Muallem S, Thomas P. Immuno and functional characterization of CFTR in submandibular and pancreatic acinar and duct cells. *Am J Physiol* 1997; 273: C442-55.
385. Zhang M, Schleicher RL, Fink AS, Gunter-Smith P, Savard C, Nguyen T, Lee SP. Growth and function of isolated canine pancreatic ductal cells. *Pancreas* 2000; 20: 67-76.
386. Zhao H, Star RA, Muallem S. Membrane localization of H^+ and HCO_3^- transporters in the rat pancreatic duct. *J Gen Physiol* 1994; 104: 57-85.
387. Zsembery A, Strazzabosco M, Graf J. Ca^{2+} -activated Cl^- channels can substitute for CFTR in stimulation of pancreatic duct bicarbonate secretion. *FASEB J* 2000; 14: 2345-56.