

UCH-FC  
MA6-B  
6643r  
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS

RESIDUOS DE MONOSACARIDOS DE LA SUPERFICIE BASAL  
DE CELULAS ACINARES DE PAROTIDA DE RATON, SECRECION  
Y PROLIFERACION CELULAR



MARIA JULIETA GONZALEZ BURGOS

1984

RESIDUOS DE MONOSACARIDOS DE LA SUPERFICIE BASAL  
DE CELULAS ACINARES DE PAROTIDA DE RATON, SECRECION  
Y PROLIFERACION CELULAR

Tesis  
entregada a la  
Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Magister en Ciencias Biológicas  
con mención en Biología Celular

por

MARIA<sup>R</sup> JULIETA GONZALEZ BURGOS

Patrocinante de Tesis: Dr. Norbel Galanti Garrone

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

Informe de Aprobación  
Tesis Magister

Se informa a la Comisión de Post-Grado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la tesis de Magister presentada por la candidata

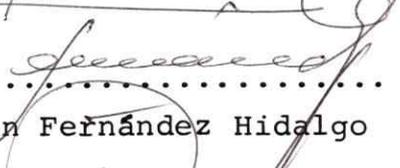
MARIA JULIETA GONZALEZ BURGOS

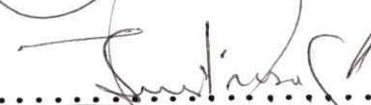
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular.

Patrocinante de Tesis

  
.....  
Dr. Norbel Galanti Garrone

Comisión Informante de Tesis

  
.....  
Dr. Juan Fernández Hidalgo

  
.....  
Dr. Nivaldo Inestroza Cantin

  
.....  
Dr. Luis Valladares Boasi

A Julio,

A mis hijos,

por su gran amor y comprensión

Quisiera expresar mi reconocimiento y gratitud:

Al Profesor Norbel Galanti, por su permanente participación en mi desarrollo académico y principalmente, por su estímulo, dedicación y enseñanza como tutor de esta tesis y su extraordinaria calidad humana.

A mis colegas Remigio López y Cecilia Alliende, por su apoyo y crítica constructiva sobre el problema de esta tesis.

A todo el personal del Departamento de Biología Celular y Genética, en especial a los académicos de la Unidad de Biología Celular y al Dr. Gustavo Hoecker, quienes con su experiencia y amistad han sido un gatillo constante en mi desarrollo.

Al Dr. Jorge Garrido, quien gentilmente me ofreció su laboratorio para guiarme en el manejo de la citoquímica de lectinas.

A Naty, por su habilidad en "traducir" y "transcribir" mis manuscritos; a Héctor por su excelente labor fotográfica y paciencia; a Roberto por el buen mantenimiento del vivero; a Juanito por su laborioso trabajo de apoyo en el laboratorio.

A Titina, por su generosa e inagotable paciencia durante la transcripción mecanográfica de este trabajo.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Profesor Norbel Galanti Garrone y financiada parcialmente por los siguientes proyectos y convenios: Proyectos N° B 1651/8533 del Departamento de Investigación y Bibliotecas (DIB); N° 1088 del Fondo Nacional y Ciencias y N° 1089 del Fondo Nacional y Ciencias.

Convenios: Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Chile y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España (CSIC).

## INDICE DE MATERIAS

	pág.
INDICE DE MATERIAS .....	i
LISTA DE TABLAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT .....	xvii
I. INTRODUCCION .....	1
II. MATERIALES Y METODOS .....	13
1. Compuestos químicos .....	13
2. Animales .....	13
3. Disección y procesamiento de parótidas .....	14
3.1 Disgregación de la glándula parótida en acinos .....	14
3.2 Homogeneización .....	15
4. Administración de las drogas .....	17
4.1 En el animal entero .....	17
4.2 En acinos aislados .....	18
5. Determinaciones químicas .....	19
5.1 Acido siálico .....	19

	pág.
6. Observaciones morfológicas .....	22
6.1 Exclusión de azul tripán .....	22
6.2 Microscopía óptica y electrónica de transmisión .....	23
7. Marcación de la superficie de células acinares con técnicas citoquímicas .....	24
7.1 Detección del estado de las uniones estrechas con lantano .....	24
7.2 Detección de residuos de mono <u>sacáridos</u> de la superficie ba <u>solateral</u> de células acinares .....	25
8. Controles de la reacción cito <u>química</u> .....	29
8.1 Inhibición competitiva .....	29
8.2 Hidrólisis enzimática .....	29

	pág.
III. RESULTADOS .....	31
Caracterización de los acinos	
Aislados de glándula parótida	
de ratón .....	31
Aspectos estructurales y ultra	
estructurales de las células	
acinares no estimuladas .....	31
Análisis funcional de las célu	
las acinares <i>in vitro</i> .....	38
Caracterización citoquímica de	
la superficie basal de las célu	
las acinares no estimuladas .....	53
Identificación de residuos de	
manosa y/o glucosa .....	53
Identificación de residuos de	
ácido siálico y/o N-acetil glu	
cosamina .....	55
Caracterización citoquímica de	
la superficie basal de células	
acinares estimuladas a secretar	
<i>in vivo</i> .....	57

	pág.
Modificaciones de la reactividad de residuos de manosa .....	58
Modificaciones de la reactividad de residuos de ácido siálico .....	60
Caracterización citoquímica de la superficie basal de células estimu ladas a secretar y a proliferar .....	62
Modificaciones en la reactividad de los residuos de manosa .....	64
Modificaciones en la reactividad de los residuos de ácido siálico .....	66
Especificidad de la reactividad a lectinas en superficie basal de células acinares estimuladas a se cretar y proliferar .....	66
Determinación del contenido de ácido siálico en acinos de células estimu ladas a secretar y proliferar .....	68
Por determinación química de ácido siálico liberado de acinos tratados con neuraminidasa .....	68

	pág.
Por unión de WGA tritiada a acinos aislados de parótidas .....	70
Detección de residuos de manosa subterminales en la superficie basal de células acinares .....	72
Caracterización citoquímica de la superficie basal de células acinares estimuladas <i>in vitro</i> .....	77
Reactividad de residuos de manosa .....	77
Reactividad de residuos de ácido siálico .....	79
Diferencia de reactividad a <u>lec</u> tinas de las superficies basal y lateral .....	82
IV. DISCUSION .....	84
V. CONCLUSIONES .....	103
VI. BIBLIOGRAFIA .....	105
VII. APENDICE DE MATERIALES Y METODOS .....	126
1 Determinaciones químicas .....	126
1.1 Proteínas .....	126

	pág.
1.2 Determinación de la actividad de $\alpha$ -amilasa .....	126
1.3 ADN .....	127
1.4 Incorporación de timidina- <sup>3</sup> H .....	129

## LISTA DE TABLAS

		pág.
TABLA I	Respuesta secretora en acinos aislados en medio mínimo y en medio enriquecido .....	43
TABLA II	Contenido de ácido siálico en acinos de parótida de ratón. Efecto de isoproterenol y pi- locarpina .....	71
TABLA III	Unión de N-(acetil- <sup>3</sup> H)- WGA a células acinares. Efecto de isoproterenol y pilocar <u>p</u> pina .....	73

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
FIG. 1.: Esquema de disgregación de la glándula parótida .....	16
FIG. 2.: Morfología de acinos teñi- dos con azul de toluidina y observado al microscopio óptico .....	32
FIG. 3.: Conservación de la es- trutura de las células a- cinares de parótida de ratón .....	34
FIG. 4.: Uniones estrechas: ultraes- trutura y hermeticidad .....	37
FIG. 5.: $\alpha$ -amilasa en homogeneizado de acinos estimulados <i>in vitro</i> .....	39
FIG. 6.: $\alpha$ -amilasa en homogeneizado de acinos incubados en medio M-199 y estimulados <i>in vitro</i> . Efecto de isoproterenol .....	41

	pág.
FIG. 7.: Patrón ultraestructural de secreción: exocitosis de gránulos de secreción .....	45
FIG. 8.: Modificación del RER después de la estimulación <i>in vitro</i> con isoproterenol y pilocarpina .....	47
FIG. 9.: Núcleos de células acinares no estimuladas y estimuladas <i>in vitro</i> con isoproterenol o pilocarpina .....	50
FIG. 10.: Incorporación de TdR- <sup>3</sup> H en acinos estimulados <i>in vitro</i> con isoproterenol .....	52
FIG. 11.: Identificación de residuos de manosa y/o glucosa en la superficie basal de células no estimuladas .....	54
FIG. 12.: Identificación de residuos de ácido siálico y/o N-acetilglucosamina en la superficie basal de células no estimuladas .....	56

- FIG. 13.; Modificación en la reactividad a Con-A de la superficie basal de células acinares de parótidas, estimuladas *in vivo* con IPR: Secreción ..... 59
- FIG. 14.: Modificación en la reactividad a WGA de la superficie basal de células acinares de parótidas estimuladas *in vivo* con IPR: Secreción ..... 61
- FIG. 15.: Modificación en la reactividad a WGA de la superficie basal de células acinares de parótidas estimuladas *in vivo* con PIL: Se creción ..... 63
- FIG. 16.: Modificación en la reactividad a Con-A de la superficie basal de células acinares de parótidas estimuladas *in vivo* con IPR: Se creción y proliferación celular ..... 65

FIG. 17.:	Modificación en la reactividad a WGA de la superficie basal de células acinares de parótidas estimuladas <i>in vivo</i> con IPR: <u>Secre</u> ción y proliferación celular .....	67
FIG. 18.:	Especificidad de la reactividad a lectinas en superficie basal de células acinares estimuladas a secretar y proliferar .....	69
FIG. 19.:	Detección de residuos de manosa subterminales en la superficie <u>ba</u> sal de células acinares .....	76
FIG. 20.:	Reactividad de residuos de manosa en la superficie basal de células acinares, estimuladas <i>in vitro</i> con IPR y PIL .....	78
FIG. 21.:	Reactividad de residuos de ácido siálico en la superficie basal de células acinares, estimuladas <i>in vitro</i> con IPR ó PIL .....	81
FIG. 22.:	Reactividad a Con-A y a WGA de la superficie lateral de las células acinares de parótida de ratón .....	83

## ABREVIATURAS

ADN	= ácido desoxirribonucleico
APC	= ácido perclórico
C	= cromatina densa
Con-A/Fer	= Concanavalina-A/Ferritina
CU	= complejo de unión
g	= gramo
G	= Golgi
GS	= gránulos de secreción
IPR	= Isoproterenol
L	= lumen
m	= microvellosidades
mi	= microfilamentos
n	= nucléolo
p.c.	= peso corporal
PIL	= pilocarpina
RER	= retículo endoplásmico rugoso
RL	= ribosomas libre
SB	= superficie basal
SL	= superficie lateral

TdR-<sup>3</sup>H            = timidina tritiada  
UE                 = unión estrecha  
WGA/Fer          = aglutinina de germen de trigo

## RESUMEN

En esta tesis se ha estudiado las modificaciones que se producen en glicoconjugados de la superficie basal de células acinares de parótida de ratón en relación a procesos como secreción y proliferación celular, mediante la detección y cuantificación de residuos de azúcares utilizando los siguientes procedimientos: 1) detección citoquímica con lectinas unidas a ferritina; 2) determinación química y, 3) determinación isotópica con lectina-radioactivas.

El análisis de los residuos de monosacáridos en la superficie basal de las células acinares se realizó en cultivo de acinos aislados de parótida de ratón. Estos acinos conservan por al menos 48 hr sus características morfológicas y funcionales. La estimulación *in vitro* con agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y colinérgicos revela que las células acinares conservan la capacidad de secretar  $\alpha$ -amilasa y de recuperar los niveles normales de concentración intracelular de esta enzima. Esta situación demuestra que los receptores se encuentran intactos y que la célula está metabólicamente activa.

Los glicoconjugados de la superficie basal de las células acinares de parótidas no estimuladas, analizadas con lectinas específicas, presentan residuos de manosa y de ácido siálico terminales. La distribución de gránulos de ferritina, después de la incubación con A-Fer, indica que los residuos de manosa se encuentran a lo largo de toda la superficie

celular y a variables distancias de la membrana plasmática. Mientras tanto, la distribución de gránulos de ferritina, después de la incubación con WGA-Fer, indica que los residuos de ácido siálico se distribuyen en forma discontinua o de parche. En ambos casos, la distribución de gránulos de ferritina y por lo tanto de los residuos de monosacáridos, es independiente de la temperatura.

La inducción de secreción en el animal entero con isoproterenol (IPR) ó pilocarpina (PIL) provoca una pérdida de residuos de manosa de la superficie basal de las células acinares de la parótida. Lo mismo se observa cuando IPR se aplica a acinos *in vitro*; ésto implica una acción directa del agonista  $\beta$ -adrenérgico sobre la superficie celular. Sin embargo, en estas condiciones PIL induce escasa secreción y no produce pérdida de residuos de manosa de la superficie basal, lo que sugiere que esta droga actúa en el animal entero a través del sistema simpático.

La secreción provocada por ambos agonistas, cuando se inyectan en el animal entero, se acompaña de un aumento en la reactividad de la superficie basal de las células acinares a ligarse con WGA-Fer y a WGA-<sup>3</sup>H. La distribución de residuos de ácido siálico se presenta continua. La estimulación *in vitro* de acinos con IPR induce los mismos cambios en los residuos de ácido siálico, que los descritos en acinos estimulados en el animal entero. Sin embargo, la estimulación *in vitro* con PIL, no modifica la distribución ni la cantidad de residuos de ácido siálico expuestos en la superficie basal de las células

acinares. Esta observación sugiere, nuevamente, que este agonista estimula la parótida del animal completo a través del sistema simpático.

Cuando las células acinares de parótida son estimuladas en el animal completo a secretar y proliferar con una dosis alta de IPR, se detectan residuos de manosa en la superficie basal, los que se distribuyen en un solo plano continuo, adyacente a la membrana plasmática. Bajo estas condiciones, se observa una drástica disminución en el contenido de residuos de ácido siálico terminal en la superficie basal de las células acinares. En consecuencia, la aparición de residuos terminales de manosa después de inducir secreción y proliferación celular puede explicarse por exposición de residuos subterminales de manosa como resultado de la salida de ácido siálico terminal.

La pérdida de residuos de monosacáridos, como resultado de la acción directa de IPR sobre la superficie basal de las células acinares, sugiere la presencia de glicosidasas y su activación por el agonista. Mecanismos enzimáticos de este tipo pueden estar involucrados en la regulación de los procesos de secreción y proliferación celular. En este contexto, las modificaciones en la membrana plasmática basal, debidos a la acción de este agonista, pueden ser una etapa fundamental en la iniciación de los procesos de secreción y proliferación celular.

## ABSTRACT

Changes in glycoconjugates of the basal surface of mouse parotid cells, during induced secretion and cell proliferation, have been studied. For this purpose, carbohydrate residues have been qualitatively and quantitatively analyzed by the following procedures: 1) cytochemical labelling by ferritin-bound lectins; 2) biochemical procedures and 3) isotopic labelling by radioactive lectins. These studies were carried out on free acini maintained in culture. Under these conditions, the structural and functional integrity of the acini is preserved for at least 48 hours.

*In vitro* stimulation by  $\beta$ -adrenergic or cholinergic agonists showed, that acinar cells are able to secrete  $\alpha$ -amylase and then to reestablish a level of enzyme activity which resembles that of non-stimulated cells. These results indicate that receptors seem to remain unaltered and cells metabolically active. Glycoconjugates at the basal surface of acini obtained from non-stimulated glands, and incubated with specific ferritin-bound lectins, exhibit terminal residues of both mannose and sialic acid. Distribution of ferritin granules, after incubation in ConA-Fer, indicates that mannose residues lie along the cell surface at several distances from the plasmalemma. Meanwhile, distribution of ferritin granules, after incubation in WGA-Fer, shows that sialic acid residues have a discontinuous or patchy

distribution. In both cases, the distribution of ferritin, and therefore that of the residues, is independent of temperature changes.

Stimulation of secretion by isoproterenol (IPR) or pilocarpine (PIL), in the complete animal, provokes loss of mannose residues from the basal surface of the acinar cells. The fact that the same effect is observed after *in vitro* stimulation by isoproterenol suggests, that this agonist acts directly on the cell surface. On the contrary, *in vitro* stimulation by PIL provokes scanty secretion and mannose residues are not lost from the basal surface. This suggests, that in the complete animal, PIL acts through the sympathetic nervous system. On the other hand, stimulation of secretion by both agonists in the complete animal is accompanied by increase in the binding of WGA-Fer and WGA-<sup>3</sup>H to receptors of the basal surface of acinar cells. In this case, the distribution of ferritin granules turns continuous. Stimulation of acini by IPR, both *in vitro* as well as in whole animal, induces the same changes. However, *in vitro* stimulation by PIL modify neither the distribution nor the amount of sialic acid residues exposed at the basal surface of the acinar cells. This observation, once again, suggests that in the whole animal PIL stimulates the parotid gland via the sympathetic nervous system.

After stimulation of secretion and proliferation, by injection of high doses of IPR, the pattern of distribution of

ferritin granules indicates, that mannose residues lie in a single continuous row throughout the basal surface of the acinar cells. Therefore, it seems likely that removal of terminal sialic acid residues allows exposure of subterminal mannose residues.

Release of monosaccharide residues, from the glycocalyx of the basal plasmalemma, suggests that IPR activates local glycosidases. An enzymatic mechanisms of this sort, that modifies the composition of the sugar residues along the cell surface, may well be involved in the mechanism that triggers secretion and cell proliferation.

## I. INTRODUCCION

La membrana plasmática es un agregado de macromoléculas fundamentalmente anfipáticas. Los fosfolípidos son los componentes básicos, constituyendo una bicapa con sus extremos polares hacia afuera y su región hidrofóbica en el interior. Esta bicapa de fosfolípidos se localiza en la interfase medio externo - medio intracelular y tiene inmersa en ellas proteínas integrales que atraviesan la bicapa ó proteínas periféricas que interaccionan con los extremos polares de los fosfolípidos (Singer y Nicolson, 1972).

Algunas proteínas integrales o periféricas y algunos fosfolípidos, llevan unida covalentemente una cadena de azúcares (oligosacárido). Esta unión generalmente es de tipo N-glicosídico, donde el grupo amino es aportado por el aminoácido asparragina. El enlace O-glicosídico, en el que el grupo hidroxilo puede provenir de una serina, treonina o hidroxilisina es menos frecuente (Corfield y Schauer, 1979, Hubbard y Robbins, 1979). El oligosacárido siempre se orienta hacia el lado externo de la célula.

La presencia de carbohidratos sólo hacia el lado extracelular confiere asimetría a la membrana plasmática, característica básica para muchas de las funciones que allí se desarrollan.

Los oligosacáridos de glicoproteínas o glicolípidos, las regiones de proteínas periféricas externas a la célula y las cabezas polares de los fosfolípidos, constituyen en conjunto la superficie celular. Los oligosacáridos en especial conforman el glicocaliz de la célula.

La presencia de este glicocaliz es muy importante para todas las células. A este nivel se registran funciones de reconocimiento molecular, como es el caso de la interacción antígeno-anticuerpo. Un ejemplo de este tipo lo encontramos en los antígenos ABO, presentes en la membrana plasmática de los glóbulos rojos y de otras células. Estos antígenos se caracterizan por tener la porción polipeptídica en común y sólo difieren en un residuo de azúcar (Watkins, 1966; Gibblett, 1969). Esta leve diferencia en un residuo de monosacárido confiere a la membrana plasmática especificidad y a la célula, individualidad.

La cadena polipeptídica de estos antígenos (ABO) es el producto de un solo gen (gen H). Por el contrario, en la síntesis del oligosacárido participan diferentes glicosiltransferasas con alta especificidad de sustrato, cada una controlada por genes diferentes (Watkins, 1966; Gibblett, 1969). Considerando este hecho, Kalckar (1965) postuló que la naturaleza de los carbohidratos presentes en la superficie de una célula estaría controlada genéticamente.

En general, los carbohidratos como componentes más externos de la membrana plasmática estarían modulando dos

grupos de funciones. Las primeras son aquellas relacionadas con la interacción y/o recepción de una señal externa. Las segundas, consecuencias de las primeras, se refieren a la traducción de esa señal en un mensaje que puede ser interpretado por la célula. Así, los monosacáridos que conforman la superficie celular pueden actuar como sensores de anticuerpos, hormonas, toxinas, interferones y agentes infecciosos (Edelman, 1976-77; Sharon, 1977; Rodríguez-Boulan y Sabatini, 1978; Fudenberg, 1978; Hughes y Sharon, 1978). Su presencia puede también definir la vida media de células en el torrente sanguíneo (Jancik y Shauer, 1974); el estado de diferenciación en que se encuentre la célula (Skutelsky y Bayer, 1983), y su paso de un estado de reposo proliferativo al ciclo de división celular (Vaheiri y col., 1972; Noonan y col., 1973; López y Galanti, 1976; Nilsson, 1982; Enrich y col., 1983).

Un carbohidrato que está presente en la gran mayoría de las células es el ácido siálico. La superficie celular presenta un alto contenido de este residuo (aproximadamente 66%); sólo pequeñas cantidades de este monosacárido (aproximadamente 16%) se ha encontrado en otras fracciones subcelulares, con excepción de lisosomas (Glick, 1971).

El ácido siálico ocupa una posición terminal en el oligosacárido del cual forma parte. Presenta grupos aniónicos con un pKa ácido ( $pK_a = 2.6$ ), encontrándose completamente deprotonado a pH fisiológico. Esta característica

confiere carga negativa a la superficie de las células que contienen este carbohidrato (Jaques, 1977).

Skutelsky y Bayer en 1983, postularon que el ácido siálico de la superficie celular desempeñaría un rol protector, enmascarando sitios crípticos que podrían ser residuos de otros azúcares u otros sitios antigénicos. Al respecto, Jancik y Shauer, (1974) demostraron que el ácido siálico de las membranas de eritrocitos estaba involucrado en el control de su vida media. Así, después de un tratamiento con neuraminidasa, los eritrocitos desaparecían de la circulación dentro de las 24 hrs, siendo absorbidos y destruidos por las células del sistema retículo-endotelial del hígado o bazo. Estos antecedentes concuerdan con los del grupo de Skutelsky y col. (1970, 76), quienes analizaron el contenido de ácido siálico de la superficie de eritrocitos de conejo durante su diferenciación. Los resultados muestran que el contenido de ácido siálico en la superficie de los eritrocitos es diferente en distintos estados de diferenciación. Hay disminución acentuada de este carbohidrato en los períodos finales de la vida de esta célula. Por el contrario, estos autores encuentran que el contenido de galactosa aumenta en la superficie de eritrocitos cuando avanza el proceso de diferenciación, (Skutelsky y Bayer, 1983). Este resultado es esperable ya que comúnmente las glicoproteínas de membranas plasmáticas llevan ácido siálico en posición terminal y galactosa en

posición subterminal.

El ácido siálico se ha encontrado estrechamente relacionado al proceso de proliferación celular. Diversos autores coinciden en proponer una disminución de este carbohidrato en una etapa temprana de la transición reposo proliferativo - proliferación celular. Los estímulos empleados son diversos. Así, Vaheri y col. (1972) y Nilsson y col. (1982) aplicando neuraminidasa a células en cultivo; López y Galanti (1976), estimulando células acinares de parótidas de ratón con un agonista  $\beta$ -adrenérgico y Enrich y col. (1983), por hepatectomía parcial observaron una relación entre desialilación de la superficie celular y estimulación de la síntesis de DNA nuclear. Estos hechos sugieren que el ácido siálico podría formar parte de moléculas de la superficie que participarían en la transmisión del estímulo que induce división celular.

Por otra parte, el ácido siálico y la galactosa están presentes en el receptor de la insulina. Cuatrecasas e Illiano (1971) y Rosenthal y Fain (1981), demostraron que la pérdida de estos azúcares de la superficie celular anula tanto la interacción de la hormona al receptor como la respuesta de la célula a la hormona. Recientemente se ha demostrado que la insulina estimula el crecimiento celular; por tanto, estos azúcares estarían participando además, en el crecimiento normal de la célula, a través de su interacción con

insulina (Baserga, 1984).

En 1980, Maylié-Pheninger y Jamieson demostraron que la expresión de monosacáridos en la superficie de células acinares, centroacinares y endoacinares del páncreas, está temporalmente correlacionada con la diferenciación de estas células. Cada tipo celular presentó un patrón de monosacáridos en su superficie. Las células acinares a los 19 días post-gestación, presentaban todos los organelos de una célula secretora exocrina. Sin embargo, la respuesta secretora solamente se presentó entre los días 20-21, concomitante a la aparición en la superficie de estas células de residuos fucosilos. Estos resultados demuestran claramente que existe una relación temporal entre la aparición de residuos fucosilos y la sensibilidad a secretagogos de células acinares de páncreas de cobayo.

Desde el punto de vista de sus componentes macromoleculares, la membrana plasmática de la gran mayoría de las células, especialmente aquéllas que forman un tejido, no es un continuo homogéneo. Así, la membrana plasmática de células epiteliales presenta sectores con diferente composición molecular. A su vez, esta regionalización molecular se correspondería con la organización en compartimentos estructurales típicos de estas células (De Camilli, 1974-76; Wisher y Evans, 1975; Meldolesi y col., 1975; Morré y col., 1977; Boulan y

y Sabatini, 1978; Carpentier, 1979; Kirby y Parr, 1979; Evans 1980; Barazzone y col., 1980; Simionescu y col., 1983, entre otros).

En general, los estudios sobre la distribución de carbohidratos en células epiteliales no han mostrado una sectorización de estos residuos en compartimentos. Probablemente ésto se debe, a las técnicas empleadas en la identificación de estos residuos y al procedimiento de disociación al que se someten los tejidos. Así, las técnicas de identificación de carbohidratos en la superficie celular han sido dirigidas a la detección de grupos funcionales (1,2 glicol) y no a la búsqueda de un monosacárido en especial (Rambourg, 1969; Thiéry y Rambourg, 1974; Alliende y col., 1978). Cuando se ha empleado sustancias específicas, como lectinas, se han utilizado células epiteliales aisladas (Amakawa y Barka, 1975; Maylié-Pheninger y Jamieson, 1979). Al respecto, Pisam y Ripoche (1976), investigaron la distribución de polisacáridos de la superficie de células epiteliales de vejiga, a diferentes tiempos después de la disociación. Los resultados mostraron una distribución diferencial de los polisacáridos a tiempos muy cortos después de la disociación. Posteriormente, se produce redistribución de éstos desde la porción apical de la célula, a la basolateral. A tiempos más largos, la distribución es continua sobre toda la superficie.

Observaciones ultraestructurales de células acinares de parótida han mostrado que la membrana plasmática se encuentra regionalizada en una zona apical y otra basolateral, delimitadas por las uniones estrechas. Esta regionalización de la membrana plasmática se correlaciona con la distribución polarizada de sus componentes subcelulares, la que a su vez está relacionada con el proceso vectorial de secreción que ocurre en estas células (Parks, 1961; 1962; De Camilli y col., 1976; Simson, 1968; Amsterdam y col., 1969; Palade, 1975; Hopkins, 1979).

Así, los secretagogos estimularían receptores ubicados en la superficie basal, induciendo exocitosis de los gránulos de secreción en el polo apical de la célula. Estímulos  $\beta$ -adrenérgicos provocan la descarga de gránulos de secreción (salida de  $\alpha$ -amilasa y de otras enzimas contenidas en los gránulos) mientras que agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos y colinérgicos provocan principalmente flujo de agua y electrolitos (Schramm y col., 1974; Mangos y col., 1975 b y c; Petersen y col., 1977).

El isoproterenol es una catecolamina sintética  $\beta$ -adrenérgica que provoca en la glándula parótida de ratón disminución del contenido de  $\alpha$ -amilasa y/o proliferación celular. La inducción de uno o de ambos procesos, depende de la dosis administrada al animal (Sans y Galanti, 1979; Santos, 1979; Alliende y col., 1977-78-79). La pilocarpina es una

droga colinérgica que produce sólo secreción, básicamente acuosa (Santos y col., 1979; Alliende y col., 1979).

Se ha observado que la inducción de secreción en la parótida por isoproterenol y pilocarpina, modifica el contenido de carbohidratos neutros y aminados de una fracción enriquecida en membranas plasmáticas (López y Galanti, 1976). En estas condiciones, también se observan cambios en los antígenos de histocompatibilidad (H-2) de la superficie de las células acinares, modificación inducida por exocitosis de gránulos de secreción (Santos, 1979).

Con una dosis alta de isoproterenol (0.67  $\mu$ moles/g peso corporal), se ha observado una caída de aproximadamente el 50% en el contenido de ácido siálico de una fracción enriquecida en membrana plasmática de parótida de ratón (López 1976; López y Galanti, 1976; Rivera, 1978; Rivera y Galanti, 1982). Los polisacáridos de la superficie de estas células adoptan una distribución diferente a la de la célula no estimulada, aunque sólo temporalmente, probablemente debido a la secreción masiva de los gránulos de secreción (Alliende y col., 1976, 78).

Si bien estos resultados muestran que hay componentes de la membrana plasmática que se pierden cuando se induce secreción y/o proliferación celular, no existe una información precisa respecto a la región de la superficie celular donde ocurren estos cambios y sobre el tipo de carbohidratos

implicado en ellos.

Aún más, la membrana plasmática basal de estas células es la región donde llegan las terminaciones nerviosas relacionadas con los receptores adrenérgicos y colinérgicos, como también los capilares. Por lo antes expuesto, resulta interesante estudiar los cambios que ocurren en glicoconjugados ácidos, neutros y básicos de la superficie basal de la célula acinar de la parótida, en relación a los procesos de secreción y proliferación celular.

Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de la parótida serían de tipo  $\beta_1$  aunque no se ha descartado la presencia de receptores  $\beta_2$  (Au y col., 1972). Esta clasificación ha sido definida en base a la especificidad de interacción de receptores con una amplia variedad de agonistas. Básicamente, receptores  $\beta_1$  presentan igual afinidad por adrenalina y noradrenalina, mientras que los receptores  $\beta_2$  exhiben alta afinidad para adrenalina (Houslay, 1984). De los estudios de purificación de estos receptores no hay antecedentes sobre la presencia de carbohidratos en ellos (Schorr y col., 1982; Cerione y col., 1983).

La estimulación de secreción a través del sistema  $\beta$ -adrenérgico involucra activación del receptor respectivo, estimulación de adenilato ciclasa, producción de AMP cíclico, activación de proteína quinasas y subsecuentemente salida de proteínas de secreción como  $\alpha$ -amilasa (Spearman y Butcher,

1981, 82a; Spearman y col., 1982b). Sin embargo, se ha visto que este mismo circuito no sería el que funciona cuando se estimula proliferación celular. Así, análogos de catecolaminas que no estimulan la producción de AMP cíclico inducen proliferación celular en parótida de ratón (Durham y col., 1974b, Durham y col., datos no publicados). Además, el uso combinado de agonistas y antagonistas inhibe la secreción sin impedir la síntesis de ADN.

El conjunto de estos resultados ha llevado a postular que la pérdida de ácido siálico contenido en moléculas integrales de la membrana plasmática de las células acinares actuaría como gatillo de la estimulación a proliferación celular (Galanti, 1978; López, 1976; López y Galanti, 1976; Rivera, 1978; Rivera y Galanti, 1982; López y Durham, 1983).

En esta tesis se persiguen los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar un sistema celular adecuado para estudiar la presencia y la distribución de monosacáridos en la superficie basal de las células acinares de parótida de ratón.
2. Caracterizar morfológica y funcionalmente este sistema celular.
3. Identificar residuos de manosa y/o glucosa, y de ácido siálico y/o N-acetil glucosamina en la superficie basal de

células acinares provenientes de glándulas no estimuladas.

4. Analizar la distribución de los residuos de azúcares antes citados.
5. Estimar el contenido y estudiar la distribución de estos residuos de carbohidratos después de estimular las células acinares a secretar y/o proliferar (*in vivo* e *in vitro*).

## II. MATERIALES Y METODOS

### 1. Compuestos químicos

La timidina (metil- $^3\text{H}$ ) 50 Ci/mmol ó 25 Ci/mmol y la aglutinina de germen de trigo (WGA-N-acetil- $^3\text{H}$ ) 1.5 mCi/mg, se compraron en New England Nuclear, Boston, MA., USA. Concanavalina-A/Ferritina (Con-A/Fer) y aglutinina de germen de trigo/Ferritina (WGA-Fer) se adquirieron en Polysciences, Inc., Warrington, PA., USA. El isoproterenol-HCl, (Clorhidrato de 1-(3-4-dihidroxifenil)-2-isopropilaminoetanol), la pilocarpina-HCl, la colagenasa tipo IV y el resto de los reactivos se compraron en Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO., USA. Los reactivos empleados en microscopía electrónica se adquirieron en Ladd Res., Burlington, VE., USA. El medio Dulbecco y la solución Hanks se adquirieron en Gibco Co., Grand Island, NY, USA. El medio M-199 fue obsequiado por el Dr. Marco Perreta, INTA, Universidad de Chile.

### 2. Animales

Se empleó ratones A/Sn, machos, de 2-3 meses de edad, mantenidos en un régimen de 14 hrs de luz y 10 hrs de oscuridad y alimentados *ad-libitum*.



### 3. Dissección y procesamiento de las parótidas

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. La región anterior del cuello se limpió con alcohol-yodado. Se disecó la piel y se expuso la región correspondiente a la glándula parótida. En esta zona se eliminó la grasa adherente y los ganglios linfáticos adyacentes. Todo el proceso se realizó en condiciones de estricta esterilidad, bajo una campana de flujo laminar, marca Envirco Clase II.

#### 3.1 Disgregación de la glándula parótida en acinos. (Fig. 1)

3.1.1 Se inyectó la glándula parótida con 0.5 ml de solución de colagenasa (Sigma Tipo IV) a una concentración de 0.7 mg/ml de Dulbecco en medio Hepes 25 mM, tamponado a pH 7.4.

3.1.2 Las glándulas distendidas se incubaron en 10 ml de la misma solución enzimática (5 glándulas/10 ml) en un matraz Erlenmeyer de 25 ml. La incubación se hizo por 15 min en baño termorregulable a 37°C, con agitación constante (120 oscilaciones/min) y renovando cada 5 min una mezcla de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (5%/95% respectivamente).

3.1.3 La suspensión de acinos se dejó decantar en el matraz y posteriormente se descartó el sobrenadante. El sedimento se incubó con 10 ml de la misma solución enzimática fresca,

por 20 min, en las mismas condiciones aplicadas en el punto 3.1.2.

3.1.4 La suspensión de acinos obtenida en el segundo tratamiento enzimático, se disgregó mecánicamente empleando una pipeta Pasteur de 1 mm y luego otra de 0.6 mm de diámetro, con punta flameada. Esta operación se realizó muy suavemente. Se centrifugó a  $130 \times g$  por 5 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó tres veces con solución Hanks. Todos estos procedimientos se realizaron a temperatura ambiente.

### 3.2 Homogeneización

La suspensión de acinos se homogeneizó en 200  $\mu$ l de tampón Bernfeld (tampón fosfato de sodio 0.02 M pH 6.9; NaCl 0.067 M) en un homogeneizador de vidrio, mediante 20 golpes manuales. El homogeneizador se lavó con 180  $\mu$ l del mismo tampón (5 golpes) y se mezcló con el homogeneizado inicial. Todas estas operaciones se realizaron en hielo (Durham y Galanti, 1974a modificado).

## FIGURA 1

## ESQUEMA DE DISGREGACION DE LA GLANDULA PAROTIDA

Glándula parótida

1a. incubación en colagenasa  
0.7 mg/ml en medio Dulbecco  
37°C O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 5/95 (%)

Lobulillos parotídeos

2a. incubación en colagenasa  
0.7 mg/ml en medio Dulbecco  
37°C O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 5/95 (%)

Agregados de acinos

Disgregación mecánica, con pipe-  
tas Pasteur 1 mm y 0.6 mm de diá-  
metro. Centrifugación a 130 x g  
5 minutos.

Sedimento de acinos

Lavados en solución Hanks por  
centrifugación a 130 x g 5 min.  
(3 veces)

Suspensión de acinos

#### 4. Administración de las drogas

##### 4.1 En el animal entero

Todos los animales se mantuvieron en ayuno por 2 hrs antes de iniciar el experimento, con acceso libre al agua. Las drogas se inyectaron en un volumen total de 0.2 ml por vía intraperitoneal, de la siguiente manera:

4.1.1 Isoproterenol (IPR) 1.5 nmoles/g de peso corporal en solución salina. En estas condiciones la droga induce la secreción de aproximadamente el 50% del contenido de  $\alpha$ -amilasa presente en células acinares de la parótida de ratón (Santos, 1979).

4.1.2 Isoproterenol 0.45  $\mu$ moles/g de peso corporal en solución salina. Con esta dosis la droga induce la secreción de aproximadamente un 95% del contenido de  $\alpha$ -amilasa de la parótida de ratón. Además, estimula síntesis de ADN y división celular en las células acinares de ésta glándula (Santos, 1979).

4.1.3 Pilocarpina (PIL) 0.27  $\mu$ moles/g de peso corporal en solución salina. Pilocarpina induce secreción de aproximadamente 70% de  $\alpha$ -amilasa presente en células acinares de la

parótida de ratón (Santos, 1979).

Los controles reciben 0.2 ml de solución salina (NaCl 0.154 M).

#### 4.2 En acinos aislados

Acinos obtenidos según se describe en el punto 3.1 se preincubaron por 30 min en medio Dulbecco 6 M-199 a 37°C, antes de aplicar el estímulo. La incubación de la suspensión de acinos con las drogas ó con timidina tritiada, se llevó a cabo en placas Falcon (3001) de 35 x 10 mm, conteniendo 2 ml de la suspensión de acinos, en un incubador con atmósfera de aire/CO<sub>2</sub> (95%/5%), (Forma Scientific, Modelo 3157), mantenido a 37°C. Las drogas se agregaron al medio de incubación de la siguiente manera:

4.2.1 Isoproterenol: Se agregó directamente al medio de incubación conteniendo acinos, a la concentración de 10<sup>-5</sup> M (respuesta secretora similar a la obtenida *in vivo* con IPR 0.45 µmoles/g de peso corporal medida con actividad de α-amilasa remanente) o la concentración de 10<sup>-6</sup> M (respuesta secretora similar a la obtenida *in vivo* con IPR 1.5 nmoles/g de peso corporal).

4.2.2 Pilocarpina: se agregó directamente al medio de incubación conteniendo acinos, a la concentración de  $10^{-3}$  M, con la que se obtuvo una respuesta secretora moderada.

Los agonistas se mantuvieron en suspensión de acinos por 30 minutos. Luego éstos se lavaron 3 veces en solución de Hanks, centrifugando cada vez a 630 x g por 5 minutos. Posteriormente los acinos se colocaron en medio fresco (Dulbecco ó M-199 y se continuó la incubación sin agonistas, tomando muestras a diferentes tiempos. Para cada droga y en cada tiempo, se tomaron muestras en triplicado.

## 5. Determinaciones químicas

### 5.1 Acido siálico

#### 5.1.1 Extracción enzimática

Suspensiones de acinos provenientes de glándulas parótidas de animales estimulados por 2 hrs con IPR 0.45  $\mu$ moles ó 1.5  $\mu$ moles/g de peso corporal ó PIL 0,27  $\mu$ moles/g de peso corporal ó inyectados sólo con solución salina, se centrifugaron a 130 x g por 10 minutos. Cada sedimento se resuspendió en 450  $\mu$ l de la solución enzimática (30 U de neuraminidasa de *Vibrio cholerae* en 1 ml de tampón acetato de sodio 0.1 M pH 5.2).

La incubación se realizó en un baño de agua a 37° C durante 30 min con agitación constante (60 oscilaciones por minuto). En forma paralela se incubaron muestras sin neuraminidasa con el objeto de medir actividad enzimática endógena. Cumplido el tiempo de incubación, cada suspensión se centrifugó a 1.000 x g por 10 min, conservando tanto los sobrenadantes como los sedimentos.

En los sobrenadantes se determinó directamente el ácido siálico. Los sedimentos se homogeneizaron como se describió en 3.2. En 1 ml se determinó el contenido de ADN y en otra alicuota se realizó hidrólisis en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 N a 80°C por 1 hora. Después de centrifugar a 1.000 x g por 10 min, se determinó el ácido siálico en el sobrenadante.

#### 5.1.2 Determinación del contenido de ácido siálico

Sobre alicuotas de 200 µl, de los sobrenadantes de las hidrólisis enzimática y química, obtenidos como se indica en 5.1.1, se agregó 20 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N y 50 µl de ácido peryódico (ácido peryódico 25 mM disuelto en HCl 125 mM). Se mezcló e incubó en un baño de agua a 37°C por 30 minutos. A continuación se agregó 40 µl de arsenito de sodio 2% disuelto en HCl 0.5 N, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente hasta que el color amarillo desapareció. Luego, se agregó

400  $\mu$ l de ácido tiobarbitúrico (ATB) 0.1 M pH 9.0 y se hirvió por 2.5 minutos. Al cabo de este tiempo se enfrió en agua-hielo. Finalmente, se extrajo el cromógeno con 1 ml de butanol/HCl (95/5 v/v) y se recuperó la fase orgánica por centrifugación a 1.500 x g por 5 minutos. En ella se midió la densidad óptica a 549 nm (Schimadzu UV-190). La curva de calibración se hizo con N-acetilneuramínico. Los resultados se expresaron como  $\mu$ g de ácido siálico liberado por mg de ADN celular. Se aplicó la técnica de Warren (1959).

### 5.1.3 Unión de ácido siálico a WGA-N (acetil-<sup>3</sup>H)

Unión de acinos provenientes de glándulas parótida de animales estimulados por 2 hrs con IPR (0.45  $\mu$ moles ó 1.5 nmoles/g de peso corporal) ó PIL (0.27  $\mu$ moles/g de peso corporal) ó no estimulados (sólo recibieron NaCl 0.154 M), se centrifugaron a 130 x g por 10 minutos. El sedimento se resuspendió en tampón PBS pH 7.2 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.0082 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.0075 M; NaCl 0.137 M; KCL 0.003 M) y se recentrifugó a 130 x g por 10 minutos. Esta operación se repitió tres veces. Luego se incubaron los acinos con 1.35  $\mu$ Ci de WGA - N(acetil-<sup>3</sup>H)/250  $\mu$ l de PBS por 30 min a 20°C. Se centrifugó cada muestra a 130 x g por 5 minutos. El sedimento se lavó cinco veces, resuspendiéndolo en PBS y centrifugando

a 130 x g por 5 minutos cada vez. Los sobrenadantes de cada lavado se guardaron separados del primer sobrenadante. El sedimento se homogeneizó en PBS como se describió en 3.2. Alicuotas de 500  $\mu$ l del homogeneizado se mezclaron con 500  $\mu$ l de NaOH 1 N y se incubó a 60°C por 30 minutos. Luego se midió la radioactividad en 500  $\mu$ l de este hidrolizado alcalino, neutralizado con 100  $\mu$ l de HCl concentrado y disuelto en 10 ml de un líquido de centelleo (PPO 0.5% y POPOP 0.05% en Tritón X-100: Xileno, 1:2 v/v). La radioactividad se midió en espectrómetro Beckman LC-100 con una eficiencia de 59%. En otra alicuota de 1 ml del homogeneizado, se extrajo el ADN y se determinó su contenido. Los resultados se expresaron en cpm de WGA-N(acetil-<sup>3</sup>H) unido por 100  $\mu$ g de ADN celular.

Las determinaciones de proteína, ADN y actividad de  $\alpha$ -amilasa aparecen en el Apéndice de Materiales y Métodos.

## 6. Observaciones morfológicas

### 6.1 Exclusión de azul tripán

En un portaobjeto se colocó una gota de la suspensión de acinos y se agregó una gota de azul tripán 0.4% en NaCl 0.154 M. Se colocó cubreobjeto y se observó al microscopio óptico. El azul tripán es un colorante muy polar y por lo

tanto, sólo penetra a las células que presentan daño a nivel de su membrana plasmática (Mangos y col., 1975).

## 6.2 Microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión

Alicuotas de la suspensión de acinos, se lavaron con tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4 y se fijaron en glutaraldehído 2% en el tampón indicado, durante 30 minutos. Se lavó en el mismo tampón por 3 veces. Se post-fijó en tetróxido de osmio 1%, empleando el mismo tampón. La fijación y la post-fijación se realizaron a temperatura ambiente. Después de la post-fijación, los acinos se lavaron y se deshidrataron en etanol, en concentraciones crecientes. Se impregnó en etanol-Epón (1:1, 1:2, 1:3 v/v, respectivamente) durante 1 hr en cada solución, a temperatura ambiente. Se incluyó en Epón y se dejó toda la noche a 37°C y luego 48 hrs a 60°C. Los bloques se cortaron con cuchilla de vidrio en un ultramicrotomo Porter-Blum MT-2. Cortes de 1  $\mu$ m se tiñeron en una solución de azul de toluidina 1% en tetraborato de sodio 1% (Chandra y Shelton, 1964). Estos cortes se observaron en un microscopio óptico. Cortes finos se contrastaron en solución de acetato de uranilo al 5% en agua destilada y deionizada, durante 30 min y con citrato de plomo según la técnica

de Reynolds (1963). Las observaciones se realizan en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Modelo ME-109 y Phillips M300.

## 7. Marcación de la superficie de células acinares con técnicas citoquímicas

### 7.1 Detección del estado de las uniones estrechas con lantano

Esta técnica sólo se realizó con el objeto de probar la hermeticidad de las uniones estrechas y con ello, la integridad de los acinos.

La suspensión de acinos provenientes de animales no estimulados, se lavó en tampón S'-colidina 0.1 M pH 7.8, que contiene silicato de sodio 0.026% y nitrato de lantano 2%. Se centrifugó a 130 x g por 3 minutos; esta operación se repitió 3 veces. El sedimento se fijó en glutaraldehído 2,5% en el tampón colidina, durante 12 hrs a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 130 x g por 5 minutos. El sedimento se re-suspendió en el mismo tampón, se centrifugó a 130 x g por 5 minutos a temperatura ambiente y se post-fijó en tetróxido de osmio 1% disuelto en el mismo tampón colidina, durante 2 hrs a temperatura ambiente (Martínez-Palomo, 1971).

Al cabo de este tiempo se lavó en el tampón 3 veces por 15 min cada vez, sedimentando cada vez a 130 x g por 5 minutos. Posteriormente, se deshidrató en etanol en concentraciones crecientes. Luego se impregnó en etanol/Epón (1:1, 1:2, 1:3 v/v) y se incluyó en Epón. Cortes finos se obtuvieron en un ultramicrotomo Porter-Blum MT-2 y se observaron sin tinción de contraste.

## 7.2 Detección de residuos de monosacáridos de la superficie basolateral de células acinares

Para este estudio se empleó lectinas vegetales, que identifican residuos de monosacáridos que ocupan una posición terminal en un oligosacárido (Sharon, 1977). Considerando que las lectinas son proteínas (o glicoproteínas), es necesario unirles a marcadores para visualizarlas con el microscopio electrónico de transmisión. En esta tesis se empleó lectina unida covalentemente a ferritina (Nicolson y Singer, 1971) y la técnica que emplea lectina y peroxidasa (Bernhard y Avrameas, 1971).

### 7.2.1 Detección de manosa y/o glucosa con Con-A-Peroxidasa

Acinos provenientes de glándula parótida de animales estimulados o no estimulados, se lavaron en tampón PBS pH 7.4 durante 5 min a temperatura ambiente, por centrifugación a 130 x g por 5 minutos. El sedimento se resuspendió en una solución con Con-A 50 µg/ml en tampón PBS y se incubó durante 15 min a 20°C. Después de centrifugar, el sedimento se lavó 3 veces en tampón PBS y se post-incubó en una solución de peroxidasa 50 µg/ml en el mismo tampón por 15 min a 20°C. Luego, el mismo sedimento se lavó 3 veces con PBS y los acinos se fijaron en glutaraldehído 2.5% en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, los acinos se lavaron nuevamente en PBS y se incubaron por 15 min a 20°C en 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 500 µg/ml en tampón Tris 0.1 M pH 7.5. Por cada 5 ml de tampón se agregó 50 µl de peróxido de hidrógeno de 30 v.

Posteriormente, los acinos se lavaron 3 veces en tampón Tris 0.1 M pH 7.4 y se post-fijaron en tetróxido de osmio 1% en PBS por 1 hr a 20°C. Después de cada lavado, las centrifugaciones se efectuaron a 130 x g por 5 minutos. Finalmente, se deshidrató en etanol, se impregnó en etanol-Epón y se incluyó en Epón.

### 7.2.2 Detección de manosa y/o glucosa con Con-A/Ferritina

Acinos provenientes de glándula parótida de animales tratados y no tratados, se lavaron en tampón Tris 0.005 M; NaCl 0.154 M; CaCl<sub>2</sub> 0.001 M; pH 7.1, durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 130 x g por 5 minutos. El sedimento se resuspendió en una solución de Con-A-Fer. 50 µg/ml en el mismo tampón antes descrito, durante 30 min a 20°C. Posteriormente, se lavaron 3 veces en el tampón y se fijaron en glutaraldehído 2.5% en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4, durante 30 min a 20°C. Después de lavar 3 veces en el tampón empleado para fijar, se post-fijaron en tetróxido de osmio 1% en el mismo tampón, por 1 hr a 20°C. Posteriormente, se lavaron en cacodilato, se deshidrataron en etanol y se procesaron para su observación al microscopio electrónico de transmisión. Después de cada lavado, las centrifugaciones se efectuaron a 130 x g por 5 minutos.

### 7.2.3 Detección de ácido siálico y/o N-acetilglucosamina con WGA-Fer

Acinos provenientes de glándulas parótidas de animales estimulados o no estimulados se lavaron 3 veces en PBS pH 7.4 a temperatura ambiente. Se incubaron en WGA-Fer 80 µg/ml en PBS y se fijaron en glutaraldehído 2,5% en tampón

cacodilato 0.1 M pH 7.4 durante 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces en el mismo tampón empleado en la fijación, se post-fijaron en tetróxido de osmio 1% en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4. Posteriormente, se procesaron en la misma forma ya descrita en el punto 7.2.2. Después de cada lavado, las centrifugaciones se efectuaron a 130 x g por 5 minutos.

#### 7.2.4 Detección de monosacáridos subterminales

Acinos provenientes de glándulas parótidas de animales estimulados con IPR 1.5 nmoles/g de peso corporal y no estimulados (sólo recibieron NaCl 0.154 M), se trataron con neuraminidasa como se indica en 5.1.1. Con este tratamiento se elimina el ácido siálico de los componentes de la superficie celular y se exponen los residuos de otros monosacáridos. Para detectar algunos de ellos se aplicó la técnica de Con A/Peroxidasa descrita en el punto 7.2.1. Paralelamente, acinos provenientes de parótidas de animales estimulados *in vivo* con IPR 0.45  $\mu$ moles ó 1.5 nmoles/g de peso corporal o no estimulados, fueron sometidos a la misma técnica citoquímica.

## 8. Controles de la reacción citoquímica

### 8.1 Inhibición competitiva

Se empleó  $\alpha$ -D-manosa y/o  $\alpha$ -D-glucosa como inhibidores competitivos de la reacción Concanavalina-A monosacáridos expuestos en la superficie celular. Con el mismo objeto, se utilizó ácido N-acetilneuramínico ó N-acetilglucosamina como inhibidores de la reacción entre WGA y residuos expuestos en la superficie celular.

Las lectinas en las concentraciones indicadas anteriormente y los monosacáridos disueltos en los tampones correspondientes en concentración 0.1 M, se preincubaron por 30 min a 20°C. Posteriormente, a esta solución se agregó suspensión de acinos y se incubó en las condiciones ya descritas. Después de esta segunda incubación, los acinos se procesaron para ser observados al microscopio electrónico de transmisión.

### 8.2 Hidrólisis enzimática

#### 8.2.1 Hidrólisis de residuos de ácido siálico

Acinos provenientes de glándulas parótidas de animales no estimulados o estimulados 2 hr antes con IPR 0.45

µmoles/g de peso corporal, se incubaron en una solución de neuraminidasa de *Vibrio cholerae*, 30 U/ml de tampón acetato 0.1 M pH 5.2. La incubación se realizó en un baño de agua a 37°C por 30 min, con agitación constante (60 oscilaciones por minuto). Al cabo de este período, la suspensión de acinos se centrifugó a 130 x g por 5 minutos y se lavó 3 veces en PBS pH 7.4. Luego, se procedió en la forma descrita en 7.2.3.

#### 8.2.2 Digestión de residuos de manosa

Los acinos provenientes de glándulas parótidas de animales no estimulados o estimulados 2 hr antes con IPR 0.45 µmoles/g de peso corporal, se incubaron en una solución de α-D-manosidasa, 2 U/200 µl de tampón acetato de sodio 0.1 M pH 4.5. Se incubó a 25°C por 60 min, con agitación constante, 60 osc./min. Posteriormente, la suspensión de acinos se centrifugó a 130 x g por 5 min, se lavó 3 veces en PBS pH 7.2 y finalmente, se procedió de acuerdo a lo descrito en 7.2.2.

## III. RESULTADOS

Caracterización de los acinos aislados de glándula  
parótida de ratón

Aspectos estructurales y ultraestructurales de las células  
no estimuladas. La suspensión de acinos representa una población heterogénea. En un corte de 1  $\mu\text{m}$  de espesor, teñido con azul de toluidina, se encuentran acinos libres (Fig. 2-a) o en agregados (Figs. 2-b, c y d).

Las células acinares mantienen su forma piramidal y su polaridad morfológica. El núcleo dispuesto en la región basal de la célula presenta una forma esférica, con un diámetro aproximado de 4,5  $\mu\text{m}$ . Se aprecia masas de cromatina densa asociadas a la envoltura nuclear, y algunos nucléolos (Figs. 2-c y d).

Los gránulos de secreción se disponen hacia la porción apical de la célula acinar, tomando en forma homogénea el azul de toluidina. Este hecho sugiere una distribución también homogénea de cargas negativas en su interior (Chandra y Skelton, 1964).

En todos los acinos se destaca la superficie basal de las células acinares, que se presenta completamente expuesta.

FIGURA 2

MORFOLOGIA DE ACINOS TEÑIDOS CON AZUL DE TOLUIDINA Y OBSERVADO  
AL MICROSCOPIO OPTICO

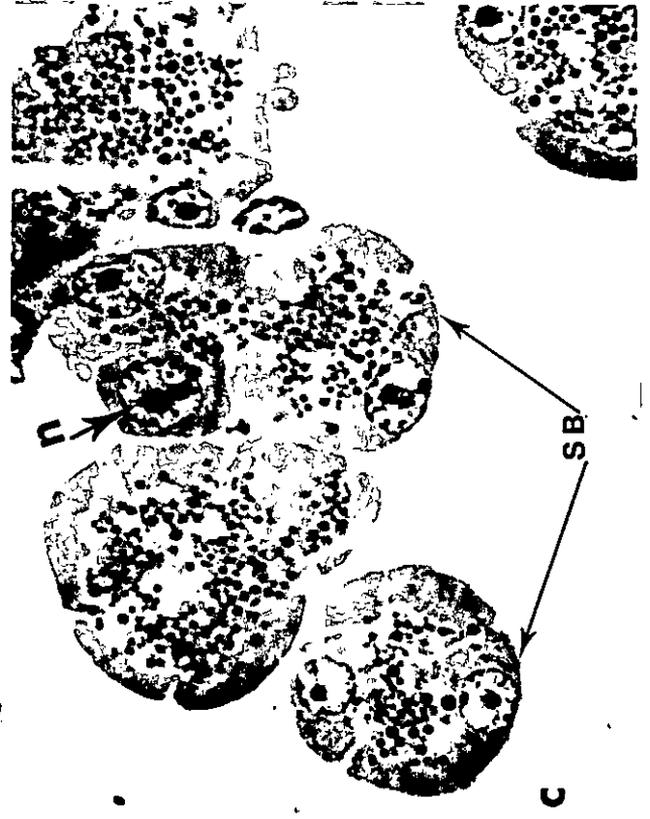
- a) Acino libre: células acinares conservan su polaridad morfológica, núcleo (N) en posición basal, gránulos de secreción (GS) en el polo apical de la célula, lumen (L) visible.
- b) Dos acinos: células acinares con características similares a las descritas en a).
- c y d) Más de dos acinos: las flechas (↑) indican la ubicación de nucléolos;(n).

En todos los acinos se expone la superficie basal (SB) de las células acinares.

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



2





En un corte fino, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo, se observan porciones de 3 células acinares (Fig. 3-a). Se distingue el lumen al que confluyen las células que se asocian entre sí en su extremo apical por complejos de unión. Se distingue un complejo de Golgi muy poco desarrollado, que se sitúa en posición supranuclear y está formado por cisternas apiladas y vesículas (Fig. 3-a).

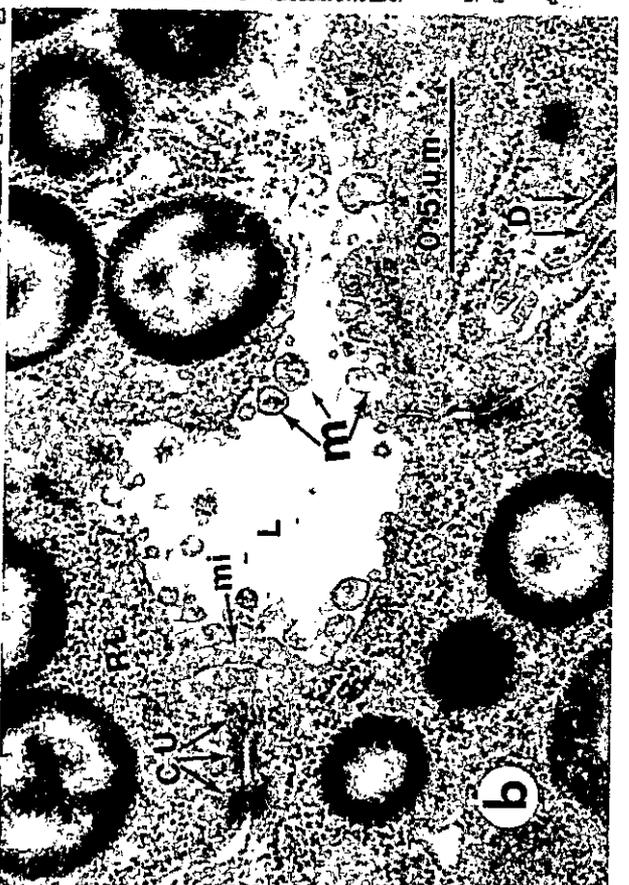
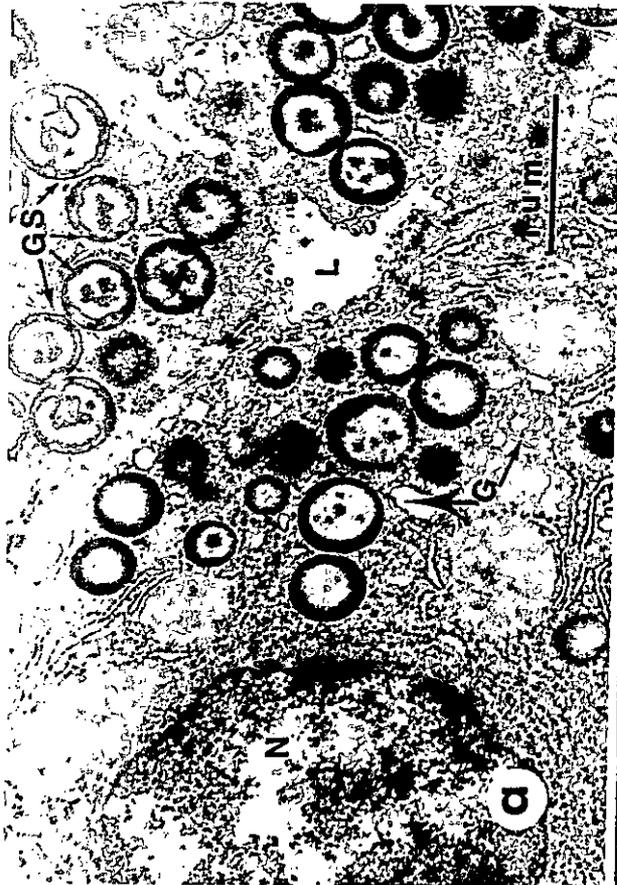
Se observa la porción de un núcleo situado distal al lumen y gránulos de secreción, distribuidos en la porción apical de la célula. Estos conforman una población heterogénea, donde predominan 2 tipos de gránulos bizonales, con una banda más externa densa y un centro, menos denso; uno de estos tipos tienen condensaciones densas en su interior. Un tercer tipo menos frecuente presenta una matriz homogénea y está generalmente situado cerca del aparato de Golgi (Fig. 3-a). Tanto los gránulos bizonales como los homogéneos, han sido descritos en parótida de rata por Scott y Pease (1951); Kurtz (1964) y Simson (1968; 1969) y en parótida de ratón por Park (1961; 1962) y Alliende y col. (1978). Entre los gránulos de secreción y próximos a la superficie apical se ven escasos ribosomas libres (Fig. 3-b).

La superficie lateral se encuentra delimitada en el ápice de cada célula por los complejos de unión. Se pueden observar con cierta frecuencia desmosomas. Tanto las superficies lateral y apical como la basal, presentan

FIGURA 3

CONSERVACION DE LA ESTRUCTURA DE LAS CELULAS ACINARES DE  
PAROTIDA DE RATON

- a) Porciones de 3 células que el lúmen (L), gránulo de secreción (GS) en posición adluminal, sistema de Golgi (+G+) y parte de un núcleo (N).
- b) Una ampliación de la microfotografía a muestra con más detalle microvellosidades de la superficie apical (m) en sección transversal y una longitudinal donde se distingue microfilamentos (mi). Ribosomas libres (+RL+) entre los gránulos de secreción, complejos de unión (CU), desmosomas (D).
- c) Parte de la superficie lateral (SL) con microvellosidades (m). El límite basolateral muestra microvellosidades de tamaño variable (BL). El retículo endoplásmico rugoso (RER) muestra su ordenamiento característico.
- d) La superficie basal (SB) se presenta sin lámina basal y presenta microvellosidades de tamaño variable. El RER se mantiene con las características normales de una célula acinar. Esta microfotografía tiene el mismo aumento que la microfotografía c).



microvellosidades. Las microvellosidades de la superficie apical son numerosas y distribuidas en toda la superficie. En un corte longitudinal de una de estas microvellosidades se observan microfilamentos (Fig. 3-b). En la superficie lateral la distribución de las microvellosidades no es continua a lo largo de ella, siendo numerosas en ciertos sectores pero no en otros (Figs. 3-a y c).

En la porción basolateral las microvellosidades son de tamaño variable (Fig. 3-c). La superficie basal presenta escasas microvellosidades, de mayor longitud y menor diámetro que las apicales y laterales. Debido al procedimiento empleado para obtener los acinos, en la superficie basal no se observa lámina basal (Fig. 3-d).

A diferencia de la porción apical de las células, las regiones citoplasmáticas contiguas a las superficie lateral y basal no presentan ribosomas libres, sino un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado. En este tipo celular el RER tiene un ordenamiento característico, en cisternas que se disponen en forma paralela y contigua (Figs. 3-c y d). Las mitocondrias mantienen su estructura (Fig. 3-c).

Uno de los objetivos de esta tesis es determinar la distribución de residuos de manosa y ácido siálico en la superficie basal de las células acinares. Sin embargo, existen evidencias que daños producidos a nivel de las uniones estrechas inducen redistribución de polisacáridos desde la

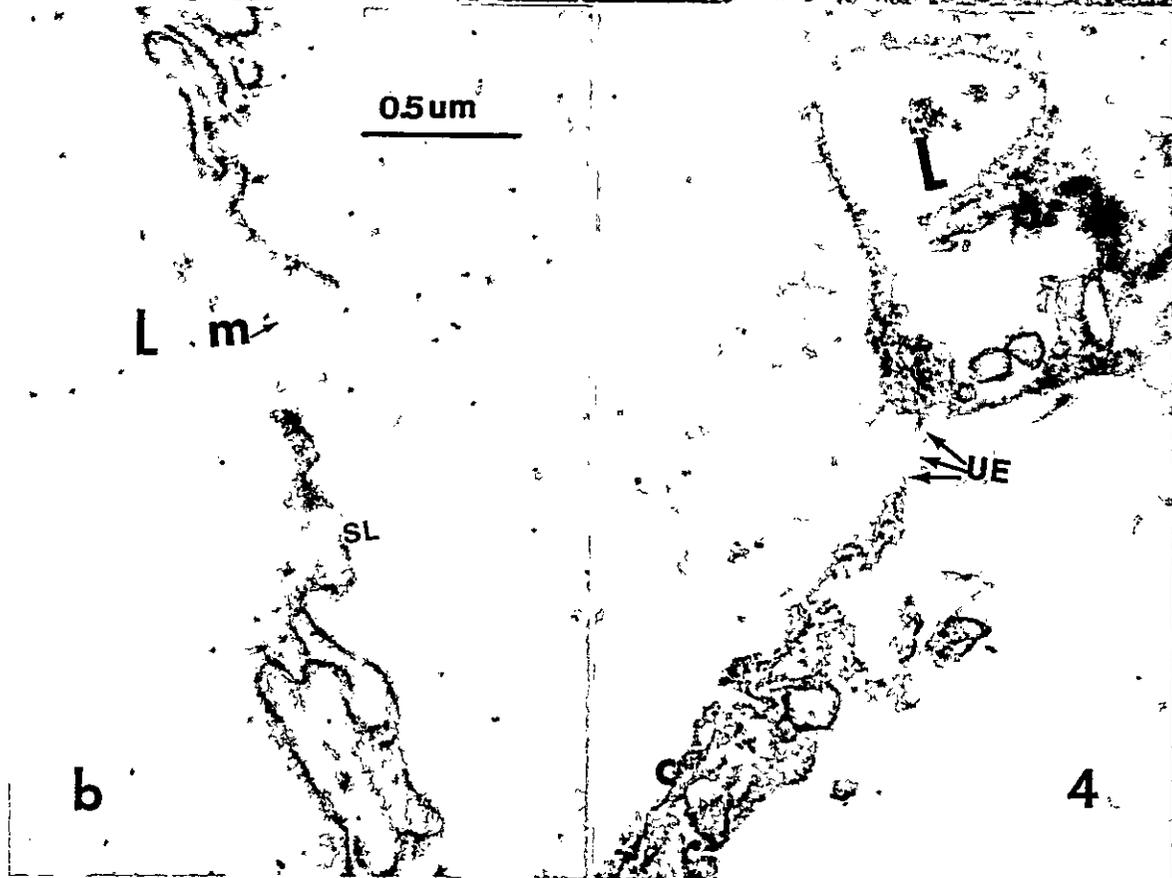
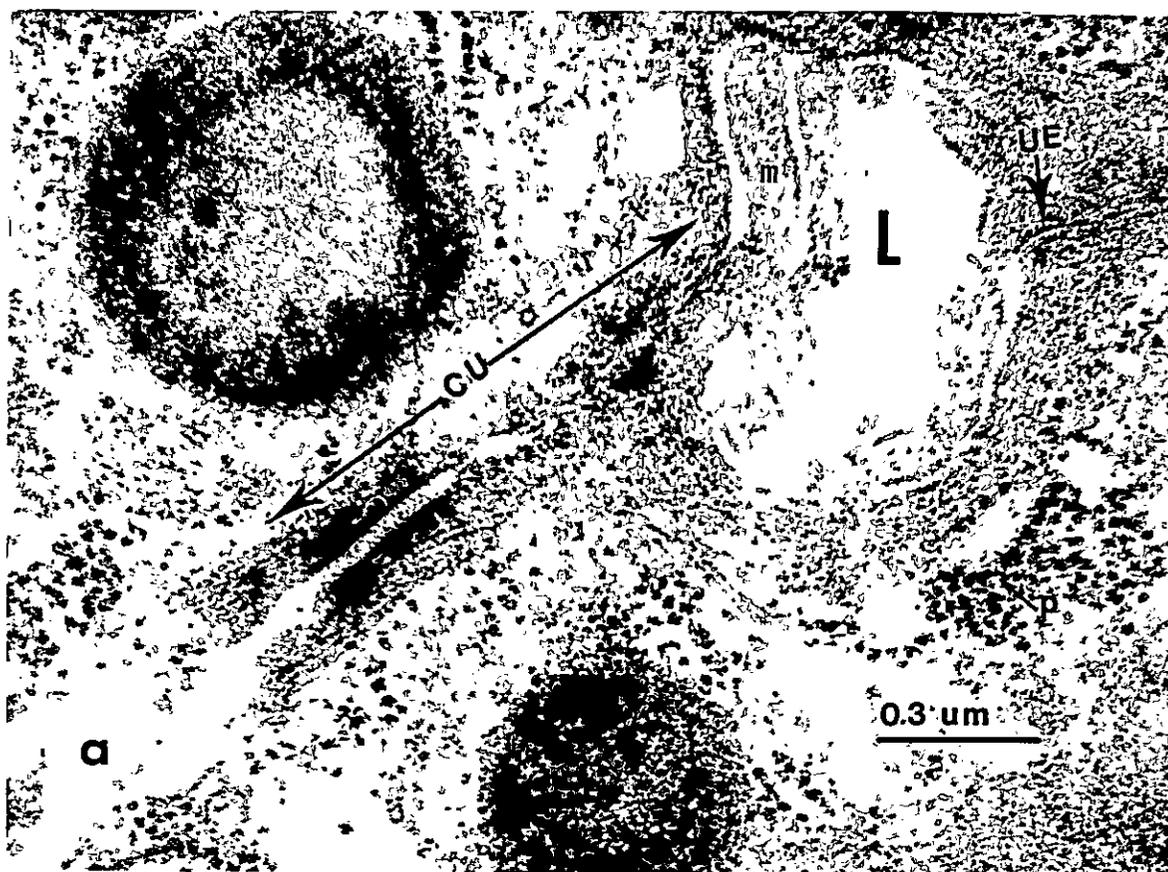
superficie apical a la basolateral, en el plano de la membrana plasmática. Esta redistribución de polisacáridos se produce a tiempos muy cortos después de la disgregación del epitelio de la vejiga (Pisam y Ripoche, 1976).

En la Fig. 4-a se muestra uniones estrechas en buena conservación, observándose el aspecto trilaminar que forman las membranas plasmáticas de dos células contiguas. La impermeabilidad de estas uniones frente a trazadores opacos a electrones se probó empleando hidróxido de lantano. De 50 acinos analizados, todos presentan depósitos de lantano en la superficie basal y lateral. No se encuentra trazador en la unión estrecha. Aproximadamente un 90% de los acinos no presentan lantano, decorando las microvellosidades del lumen, sólo un 10% de ellos aparecen marcados en esta región (Figs. 4-b y c). Sin embargo, aún en estos casos, la unión estrecha se encuentra sin trazador, lo que sugiere que el lantano ingresa al lumen por el ducto proximal. Este hecho indica que la técnica de disgregación de la glándula parótida no daña mayormente las uniones estrechas, las que se encuentran morfológicamente intactas. Por lo tanto, no es esperable que la disgregación provoque reordenamiento importante de residuos de azúcares en el plano de la membrana plasmática.

#### FIGURA 4

##### UNIONES ESTRECHAS: ULTRAESTRUCTURA Y HERMETICIDAD

- a) Se observa con nitidez un complejo de unión, con sus componentes bien conservados. La unión estrecha (UE) con su configuración trilaminar (↑). El lumen (L) presenta microvellosidades (m). Adyacente al lumen se ven polisomas (p↑).
- b) Células acinares tratadas con hidróxido de lantano. La superficie lateral (SL) muestra depósitos de este trazador. La flecha (↑) indica zona cercana al lumen sin trazador que correspondería a la ubicación de la unión estrecha. El lumen (L) muestra 2 microvellosidades (←m→) y no presenta lantano.
- c) El lumen (L) de un acino presenta la superficie apical con depósitos de lantano. La superficie lateral también se encuentra decorada con este trazador, excepto la región correspondiente a la unión estrecha (↑). El aumento de esta microfotografía es el mismo de b).



Análisis funcional de las células acinares *in vitro*

Secreción y resíntesis de  $\alpha$ -amilasa en acinos estimulados con IPR ó PIL. La determinación de  $\alpha$ -amilasa remanente en parótida como una medida de secreción, después de aplicar secretagogos, está ampliamente fundamentada (Byrt, 1966; Barka y col., 1975; Mangos y col., 1975b y c; Sans y Galanti, 1975-79; Santos y Galanti, 1978). Esta enzima es uno de los principales componentes de los gránulos de secreción (Kraus y Mestecky, 1971; Tanaka y col., 1981). Igualmente células acinares pierden gránulos de secreción después de estímulos apropiados (Simson, 1968, 69; Amsterdam, 1969; Alliende y col., 1978).

Acinos estimulados *in vitro* con IPR  $10^{-6}$  M ó PIL  $10^{-3}$  M se homogeneizaron y la actividad de  $\alpha$ -amilasa remanente en los acinos y el contenido de proteínas fue determinado.

En la Fig. 5 se muestran los resultados obtenidos. La actividad específica remanente de la enzima en los acinos alcanza un mínimo a los 30 min después de administrados los agonistas, con PIL se observa recuperación de los valores controles hacia las 2 hrs mientras que con IPR se alcanza los niveles de acinos no estimulados hacia las 6 horas. Empleando las mismas drogas en dosis que inducen sólo secreción en el ratón entero, se observa la misma tendencia (Santos y Galanti, 1976).

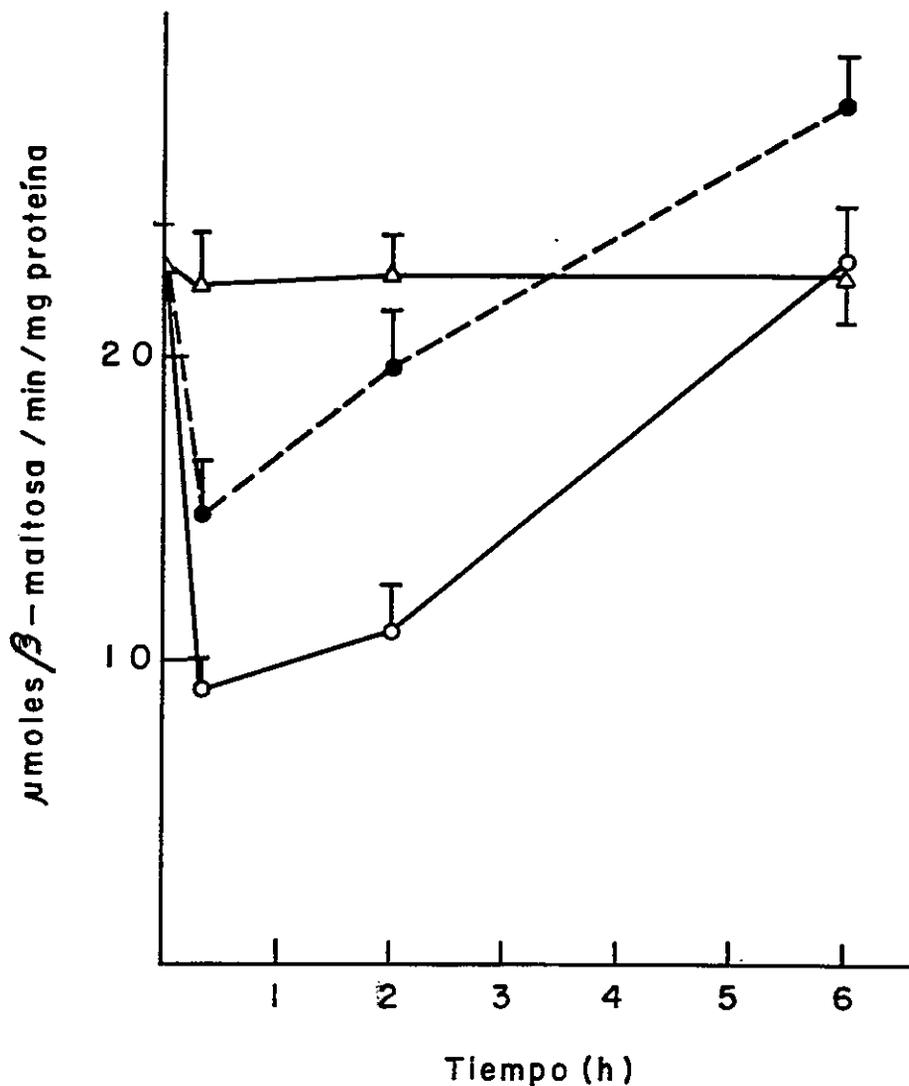


FIG. 5. EFECTO DE ISORPOTERENOL Y PILOCARPINA SOBRE EL CONTENIDO DE  $\alpha$ -AMILASA EN ACINOS ESTIMULADOS *IN VITRO*.

Los acinos se incubaron en medio mínimo (Dulbecco) y se estimularon con IPR  $10^{-6}$  M (○---○) y PIL  $10^{-3}$  M (●---●), los acinos controles (no estimulados), recibieron solución salina estéril (Δ---Δ). Al cabo de 30 min se lavaron y se tomaron muestras a las 1/2, 2 y 6 hr después de la estimulación. De los acinos no estimulados se tomaron muestras a 0, 1/2, 2 y 6 hr después de agregar solución salina. Tanto los acinos estimulados como los no estimulados se homogeneizaron y en una alícuota se determinó actividad de la enzima remanente en los acinos y en otra se midió proteínas. (N = 4, determinaciones en triplicado).

Empleando IPR  $10^{-5}$  M, se observó un máximo de secreción hacia 1 h después de la estimulación, sin recuperación de los niveles controles de actividad de la enzima en el tiempo estudiado (24 hrs). Considerando que esta incubación es prolongada y que se realiza en un medio mínimo, se repitió este experimento empleando un medio enriquecido. En la Fig. 6 se muestran los resultados. La actividad remanente de la enzima en los acinos alcanza un mínimo de 1 hr después de aplicado el agonista. A las 6 hrs se aprecia una leve tendencia a la recuperación, la que se logra a las 24 hrs, cuando los niveles de la enzima superan en un 33.6% el valor control inicial (0 hr) y en un 16,2% el valor control final (24 hrs).

De las Figs. 5 y 6 se desprende que las células acinares conservan la capacidad de responder a agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y colinérgicos, reflejada en la pérdida de  $\alpha$ -amilasa observada. Por otra parte, las células se encuentran metabólicamente activas por cuanto son capaces de recuperar los niveles iniciales de la enzima. Además, el hecho que la intensidad de la respuesta secretora depende de la dosis de agonista utilizada es otro parámetro que indica el buen estado funcional de los receptores.

Sin embargo, fue importante determinar la actividad de los receptores en acinos incubados por 24 hrs en el medio mínimo y en el medio enriquecido.

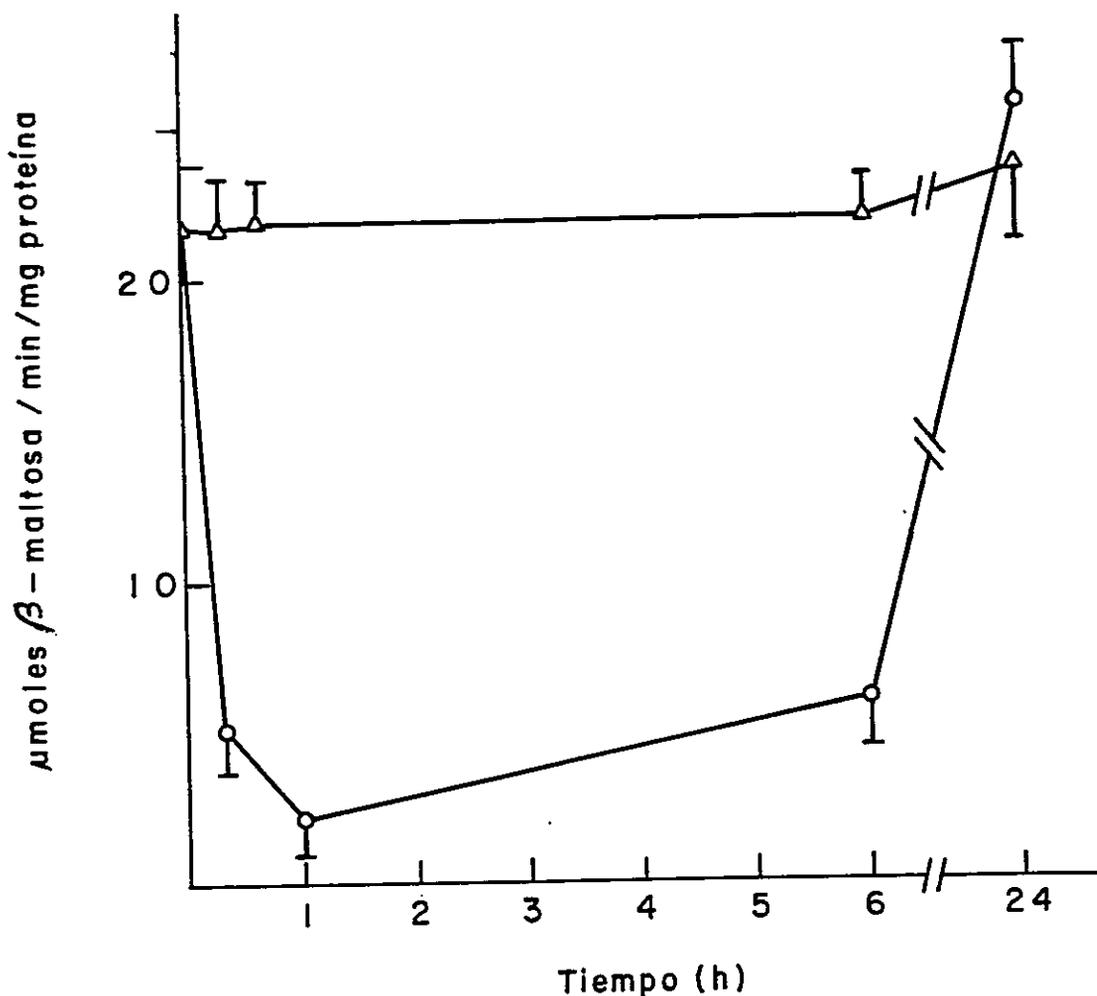


FIG. 6. EFECTO DE ISOPROTERENOL SOBRE EL CONTENIDO, DE  $\alpha$ -AMILASA EN ACINOS INCUBADOS EN MEDIO M-199 Y ESTIMULADOS *IN VITRO*.

Acinos aislados se incubaron en medio enriquecido (M-199) y se estimularon con IPR  $10^{-5}$  M (o\_\_o). Los acinos controles (no estimulados) recibieron solución salina estéril ( $\Delta$ --- $\Delta$ ). Se tomaron muestras de acinos a las 0, 1/2, 1, 6 y 24 hrs. Los acinos se homogeneizaron y en una alícuota se midió proteínas y en otra se determinó la actividad de la enzima. (N = 3 determinaciones en triplicado).

Muestras en triplicado de suspensión de acinos se in cubaron en Dulbecco o en M-199 durante 24 horas. Al cabo de este período y a tiempo 0 se estimularon con IPR  $10^{-5}$  M por 30 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla I. A tiempo 0 la actividad específica de la enzima remanente es la misma en ambos medios. Sin embargo, a las 24 hrs se observa una disminución de aproximadamente un 60% en medio mínimo, mientras que la actividad específica de la enzima se mantiene en medio M-199. Después de la estimulación de los acinos *in vitro*, a tiempo 0 se observó que la actividad relativa de la enzima cayó a los mismos niveles en ambos medios. Lo mismo se observó cuando se estimularon con IPR acinos mantenidos 24 hrs en los medios de cultivo. Sin embargo, la respuesta que se obtuvo en este caso fue claramente menor.

Es poco probable que la caída de la actividad enzimática remanente después de incubar 24 hrs en medio mínimo pueda atribuirse a muerte celular o a alteraciones morfológicas. En efecto, controles morfológicos de viabilidad celular empleando azul tripán mostraron que un 95% de las células acinares excluyeron este colorante a las 24 horas. Por otra parte, la estructura de la membrana plasmática no presentó modificaciones. Por tanto, la disminución de la respuesta secretora en acinos sometidos a incubaciones prolongadas podría deberse a una disminución ó a una alteración de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de la membrana plasmática.

TABLA I

RESPUESTA SECRETORA A IPR DE ACINOS AISLADOS EN MEDIO DE CULTIVO MINIMO Y  
EN MEDIO DE CULTIVO ENRIQUECIDO

Tiempo	M e d i o				Act. rel.
	Dulbecco		M-199		
	Control	IPR $10^{-5}$ M	Control	IPR $10^{-5}$ N	Act. rel.
(h)		$\mu$ moles	$\beta$ -maltosa/min/mg prot.		
0	$23.6 \pm 0.3$	$6.15 \pm 1.1$	26.1	$21.7 \pm 2.3$	125.8
24	$11.0 \pm 0.1$	$5.2 \pm 0.5$	47.3	$24.9 \pm 1.6$	$11.6 \pm 0.3$ 46.5

Acinos aislados se incubaron en medio mínimo (Dulbecco) o medio enriquecido (M-199) durante 24 hrs. Al cabo de este tiempo y a tiempo 0, los acinos se estimularon durante 30 min con Isoproterenol  $10^{-5}$  M. Posteriormente, se lavaron por centrifugación a 630 x g 5 min (3 veces) y se homogeneizaron. En una alícuota del homogeneizado se midió la actividad de  $\alpha$ -amilasa y en otra se midió proteínas. El control corresponde a acinos no estimulados. (N = 2; determinación en triplicado). La actividad relativa se calculó respecto a cada control.

Act. rel. : actividad relativa

IPR : Isoproterenol

h : hora

N : número de experimentos

Modificaciones estructurales en células de acinos estimulados con IPR ó PIL. Considerando que otro patrón de secreción es la exocitosis de gránulos de secreción, paralelamente a la medición de los niveles de actividad de amilasa, se procesaron muestras para su observación al microscopio electrónico de transmisión.

En la Fig. 7 se observa que acinos estimulados con IPR  $10^{-6}$  M ó PIL  $10^{-3}$  M muestran máxima degranulación 30 min después de administrados los agonistas (Figs. 7-a y c). Esto se correlaciona en el tiempo con la máxima secreción de  $\alpha$ -amilasa descrita en la Fig. 5. Algunos de los gránulos de secreción remanente después de la estimulación con IPR  $10^{-6}$  M ó PIL  $10^{-3}$  M presentan aspecto homogéneo, mientras que la gran mayoría corresponden a gránulos bizonales, con características diferentes de los que se encuentran en una célula acinar no estimulada (zona periférica densa y zona central clara). Este tipo de gránulos ha sido descrito por Múnger (1958) en páncreas y por Castle y col. (1972), en parótida de conejo. Según estos autores, corresponderían a gránulos de secreción inmaduros.

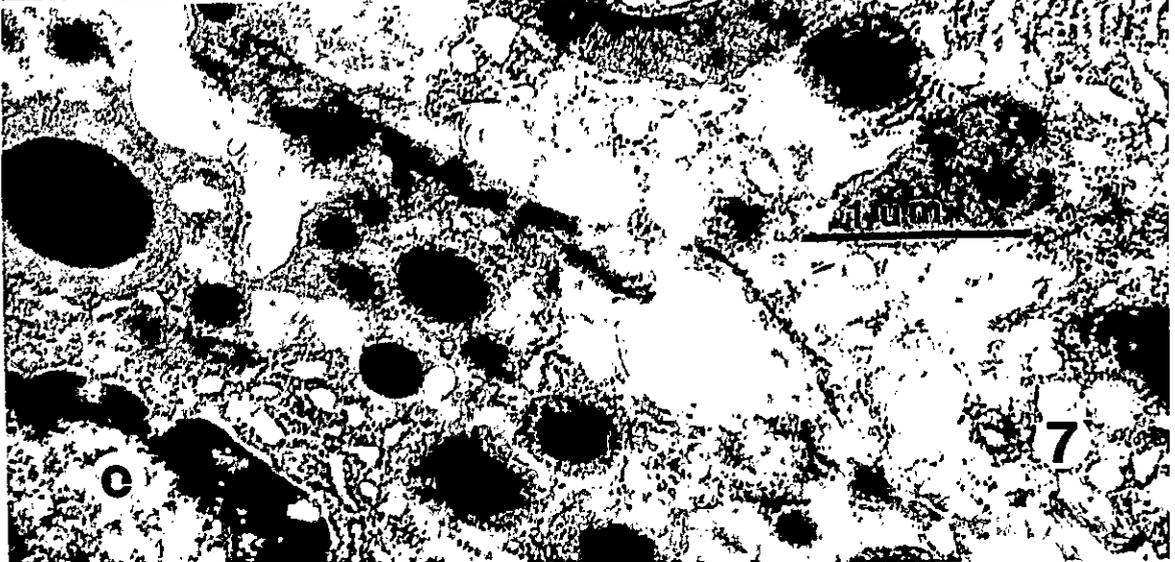
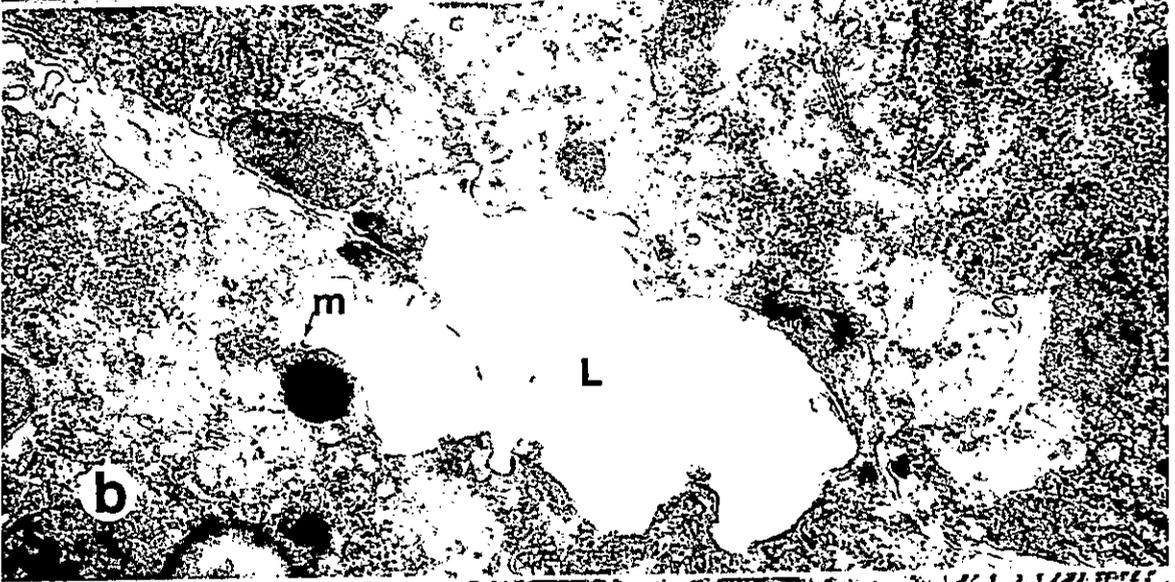
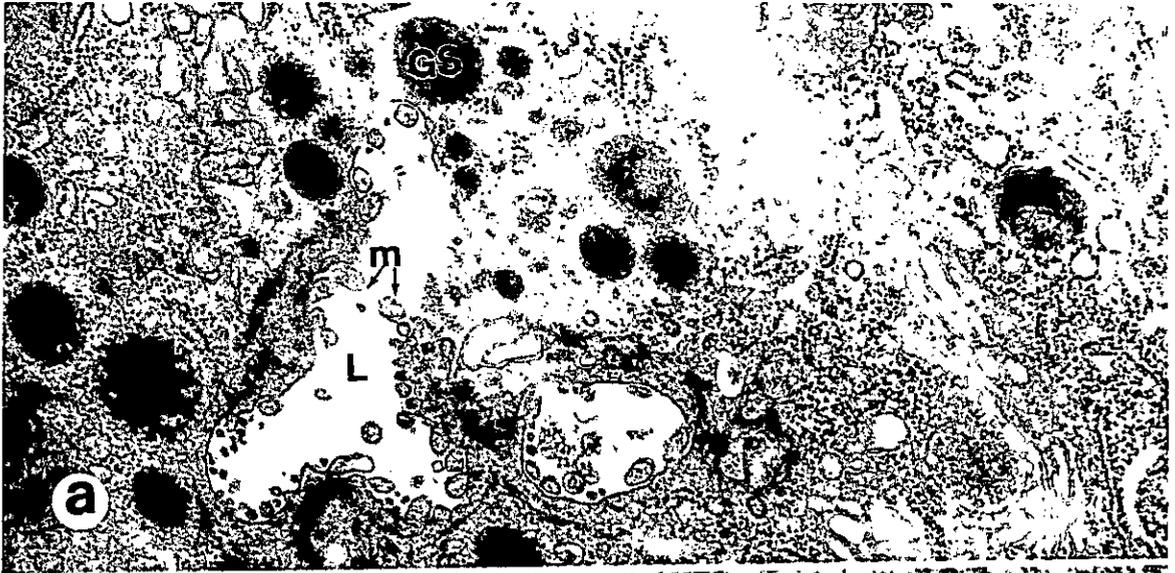
Las células acinares se degranularon totalmente 1 hr después de la estimulación de los acinos *in vitro* con IPR  $10^{-5}$  M (Fig. 7-b).

FIGURA 7

PATRON ESTRUCTURAL DE SECRECION. EXOCITOSIS DE GRANULOS  
DE SECRECION

- a) Las células acinares tratadas *in vitro* IPR  $10^{-6}$  M mues  
tran gránulos de secreción remanentes (GS). El lumen  
(L) levemente dilatados, conservan sus microvellosida-  
des (m).
- b) Las células acinares tratadas *in vitro* con IPR  $10^{-5}$  M  
No se distinguen gránulos de secreción. El lumen (L)  
muy dilatado y muy escasas microvellosidades (m).
- c) Las células acinares tratadas *in vitro* con PIL  $10^{-3}$  M  
presenta gránulos de secreción bizonales (GS), diferen  
tes a los encontrados en células no estimuladas.

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



El lumen de los acinos se observa poco dilatado y conservando sus microvellosidades después de estímulos que no provocan exocitosis masiva (Figs. 7-a y c). Por el contrario, el lumen se dilata considerablemente, perdiéndose muchas de las microvellosidades, cuando la degranulación es completa (Fig. 7-b). Resultados similares se han observado *in vivo*, estimuladno secreción con las mismas drogas (Alliende y col., 1977, 1979).

Otro componente celular que sufre modificaciones es el retículo endoplásmico rugoso. En la Fig. 8-a se muestra las características normales del RER que ya fueron descritas en las Figs. 3-c y d. Las cisternas de este organelo se presentan dilatadas después de incubar los acinos con agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y colinérgicos (Fig. 8-b). Esta dilatación fue máxima 30 min después de la incubación con IPR  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M ó PIL  $10^{-3}$  M, recuperándose casi totalmente 1 hr después, excepto para la concentración mayor del agonista  $\beta$ -adrenérgico. Una hora después de la estimulación con IPR  $10^{-5}$  M se observó un aumento de ribosomas libres en la región apical y basal de la célula. Es importante destacar que en células no estimuladas esta última región contiene escasos ribosomas (Figs. 8-c y d).

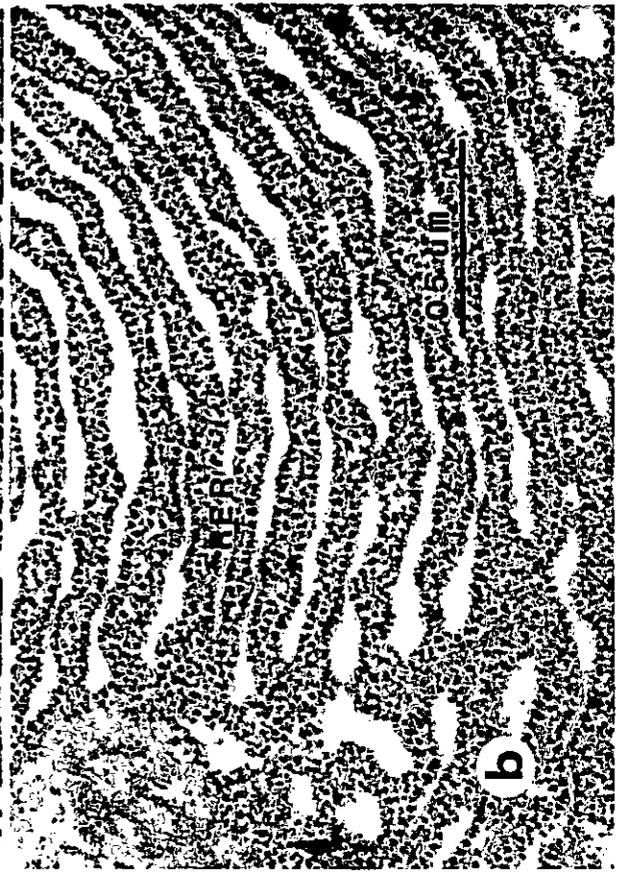
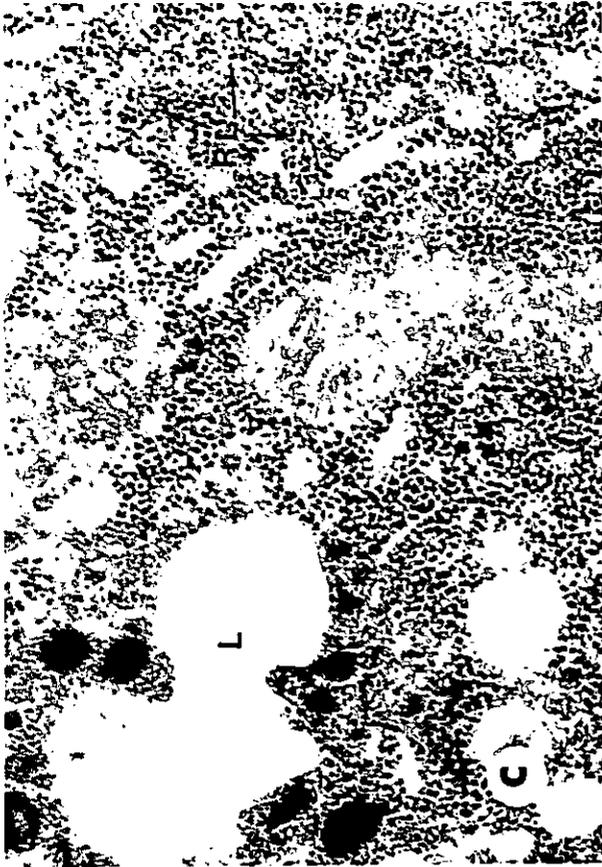
Los cambios observados en el retículo endoplásmico rugoso también han sido encontrado en los estudios *in vivo* (Alliende y col., 1977, 1979). La dilatación de las cisternas

FIGURA 8

MODIFICACIONES DEL RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO DESPUES DE LA  
ESTIMULACION *IN VITRO* CON ISOPROTERENOL Y PILOCARPINA

- a) Células acinares no estimuladas e incubadas por 30 min, presentan el RER muy desarrollado y ordenado en cisternas paralelas, una al lado de la otra.
- b) Células acinares estimuladas *in vitro* con IPR  $10^{-6}$  M ó  $10^{-5}$  M ó PIL  $10^{-7}$  M. Treinta minutos después de la estimulación se observó las cisternas del RER muy dilatadas.
- c y d) Células acinares estimuladas *in vitro* con IPR  $10^{-5}$  M muestran grandes zonas de ribosomas libres, tanto en la región cercana al lumen (c) como en la región basal de la célula (d). En d también se observan vesículas de baja densidad (V) a los electrones.

Todas las microtofografías tienen el mismo aumento.



de este componente celular, además ha sido observada cuando se ha administrado *in vivo* cicloheximida. Este efecto se correlaciona en el tiempo con períodos de máxima inhibición de la síntesis de proteínas, sin que se observe aumento de ribosomas libres. Estos sólo se presentaron en los estudios *in vivo*, después de administrar la dosis de IPR que además de secreción induce proliferación de las células acinares (Alliende y col., 1979).

En la Fig. 8-d, se observan vesículas que presentan baja densidad a los electrones y que se encuentran en la región basal de las células acinares estimuladas. Estas vesículas han sido descritas después de la estimulación *in vivo* con drogas tanto  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicas como colinérgicas (Simson, 1968).

El núcleo es otro organelo que se modifica después de la estimulación de las células acinares con IPR. Treinta minutos o 1 h después de estimular los acinos con IPR  $10^{-6}$  M ó  $10^{-5}$  M respectivamente (Figs. 9-c y d), los núcleos de las células acinares presentan una distribución de la cromatina distinta a la de células no estimuladas o estimuladas con PIL  $10^{-3}$  M (Figs. 9-a y b). La cromatina densa aparece conglomerada en bloques de mayor tamaño que en las células no estimuladas. Como resultado del tratamiento con IPR el núcleo y nucléolo disminuyen de tamaño y esto es más evidente cuando se emplea la concentración más alta del agonista.

Estas observaciones se correlacionan en el tiempo con los períodos de máxima respuesta secretora de estas células, descritas en la Figs. 5 y 6. La recuperación de los niveles controles de  $\alpha$ -amilasa se obtienen a tiempos más prolongados después de IPR  $10^{-5}$  M, período en que el núcleo y el nucléolo vuelven a su estructura original (Fig. 9-a). Estos resultados sugieren que los cambios manifestados en el núcleo después de estimular con IPR  $10^{-5}$  M, podrían indicar una disminución en actividad de transcripción.

Las modificaciones morfológicas observadas en acinos aislados y estimulados *in vitro* con los agonistas se correlacionan con las variaciones en los niveles de  $\alpha$ -amilasa frente a los mismos estímulos.

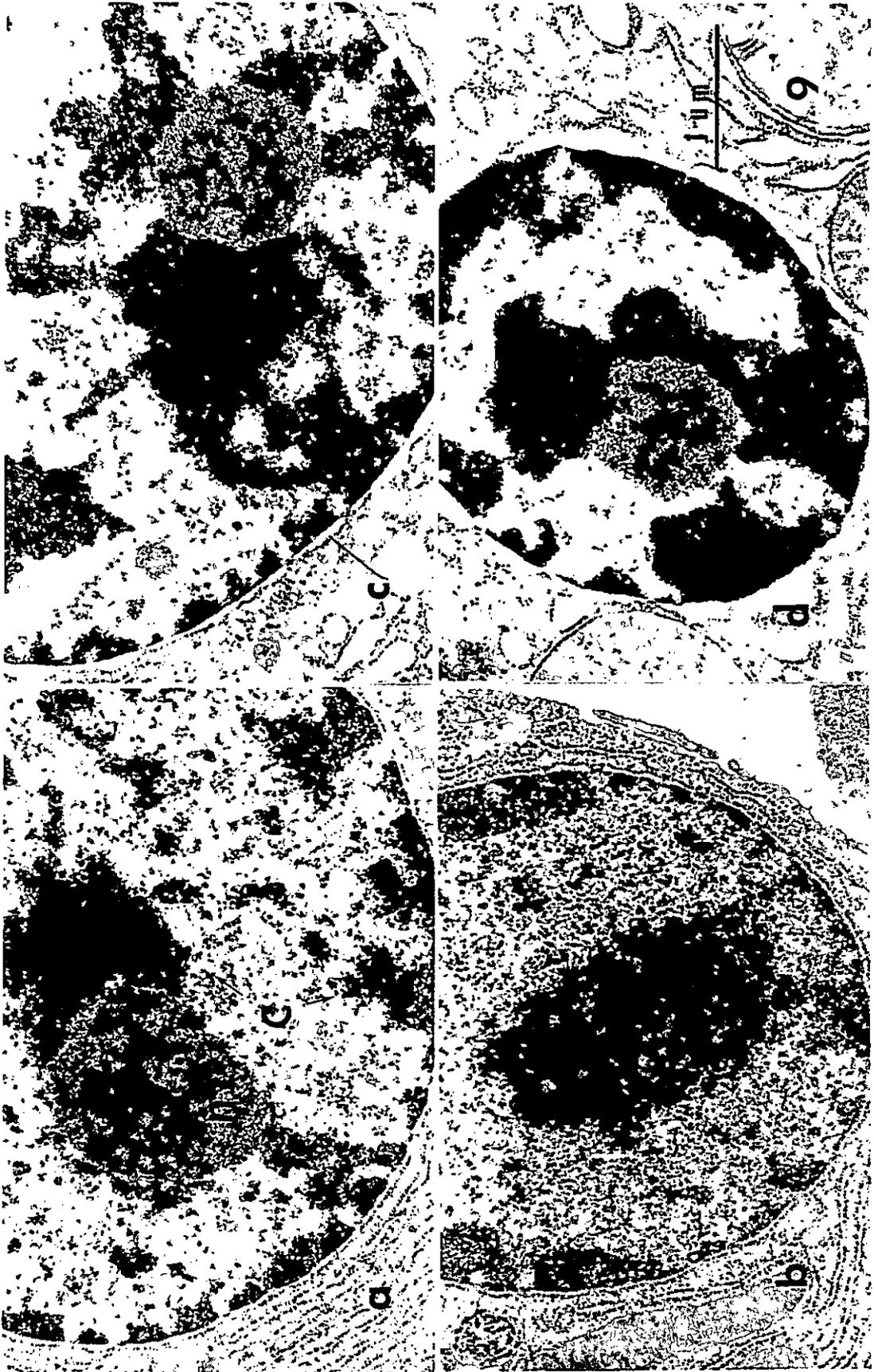
Así, PIL  $10^{-3}$  M e IPR  $10^{-6}$  M provocan una descarga parcial de los gránulos de secreción, que coincide en su magnitud y en el tiempo con la disminución en el contenido de  $\alpha$ -amilasa en esas condiciones. De la misma manera, IPR  $10^{-5}$  M provoca una descarga masiva de los gránulos de secreción que nuevamente corresponde en el tiempo con una caída vertical de  $\alpha$ -amilasa.

La rápida recuperación en los niveles de la enzima observada después de PIL  $10^{-3}$  M e IPR  $10^{-6}$  M puede relacionarse con el aspecto morfológico menos alterado que presentan las células acinares frente a estos estímulos. Esto es especialmente notable en el caso de RER. Por el contrario,

FIGURA 9

NUCLEOS DE CELULAS ACINARES NO ESTIMULADAS Y ESTIMULADAS *IN VITRO* CON ISOPROTERENOL Y PILOCARPINA

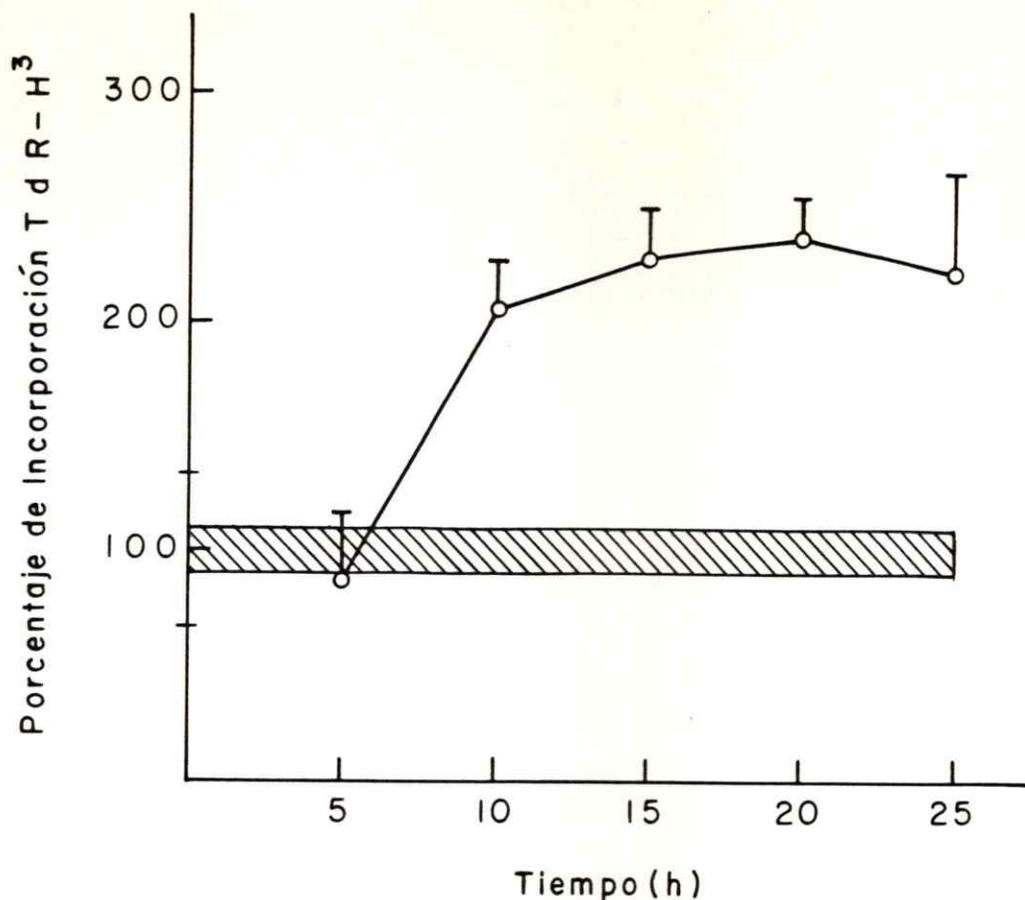
- a) El núcleo de una célula acinar no estimulada, presenta cromatina densa asociada a la membrana nuclear interna y al nucléolo (+C+). El nucléolo (n) presenta una estructura fibrilo-granular.
- b) El núcleo de una célula acinar estimulada *in vitro* con PIL  $10^{-3}$  M. No presenta modificaciones visibles respecto a lo descrito en a).
- c) El núcleo de una célula acinar estimulada *in vitro* con IPR  $10^{-6}$  M. Treinta minutos después presenta un aumento aparente de la cromatina densa, especialmente la asociada al nucléolo (↑). El nucleólo se observa más compacto que el nucléolo de las células no estimuladas ó estimuladas con PIL  $10^{-3}$  M.
- d) El núcleo de una célula acinar estimulada *in vitro* con IPR  $10^{-5}$  M. Una hora después presenta acentuada las características descritas en c).
- Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



la recuperación más lenta de los niveles de  $\alpha$ -amilasa después de estimular los acinos con IPR  $10^{-5}$  M puede relacionarse con los cambios en la organización del RER y del núcleo, producido por este mismo estímulo. Resultados similares se han observado en glándulas parótidas de animales estimulados *in vivo* con los mismos agonistas (Alliende y col., 1977; Santos y Galanti, 1978).

Considerando la respuesta de los acinos aislados a los agonistas, la recuperación de los niveles de  $\alpha$ -amilasa después de la estimulación, la relación entre concentración de agonista y magnitud de la respuesta secretora, como también las modificaciones ultraestructurales observadas y su recuperación en el tiempo, sumado todo esto a la estricta correlación en animales estimulados *in vivo*, se concluye que la preparación de acinos aislados representa un sistema celular adecuado para los estudios propuestos en esta tesis.

Incorporación de timidina tritiada (TdR-<sup>3</sup>H) en acinos estimulados *in vitro* con isoproterenol. Acinos aislados se incubaron durante 30 min con IPR  $10^{-5}$  M en medio M-199. Cada 5 hrs. después de la estimulación se dio un pulso de TdR-<sup>3</sup>H por 30 minutos. En la Fig. 10, se observa un aumento en la incorporación de TdR-<sup>3</sup>H desde las 10 hrs, que se mantiene hasta el final del experimento. Este resultado sugiere que la concentración de IPR que induce secreción masiva, provoca además,



**FIG. 10.** INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (Tdr-<sup>3</sup>H) EN ACINOS ESTIMULADOS CON ISOPROTERENOL.

Acinos aislados se incubaron en medio M-199 y se estimularon con IPR  $10^{-5}$  M (o o) durante 30 minutos. Los acinos no estimulados recibieron solución salina estéril. Cada 5 hr (5, 10, 15, 20 y 25 hr) se dio un pulso de Tdr-<sup>3</sup>H por 30 minutos. Luego, los acinos se centrifugaron, se lavaron y se homogeneizaron. En una alícuota del homogeneizado se midió la radioactividad y en otra se determinó el contenido de ADN celular. (N = 3, determinaciones en triplicado).

estimulación de la síntesis de ADN en los acinos aislados.

Resultados similares se han obtenido por estimulación *in vivo* de las glándulas parótidas de ratón con este agonista. En efecto, sólo dosis que provocan descarga masiva de  $\alpha$ -amilasa inducen síntesis de ADN en células acinares de la parótida (Sans y Galanti, 1979).

Estos hechos nuevamente indican que la preparación de acinos aislados responde *in vitro* a la estimulación con agonistas de manera similar a lo observado cuando éstos se aplican al animal entero.

#### Caracterización citoquímica de la superficie basal de las células acinares no estimuladas

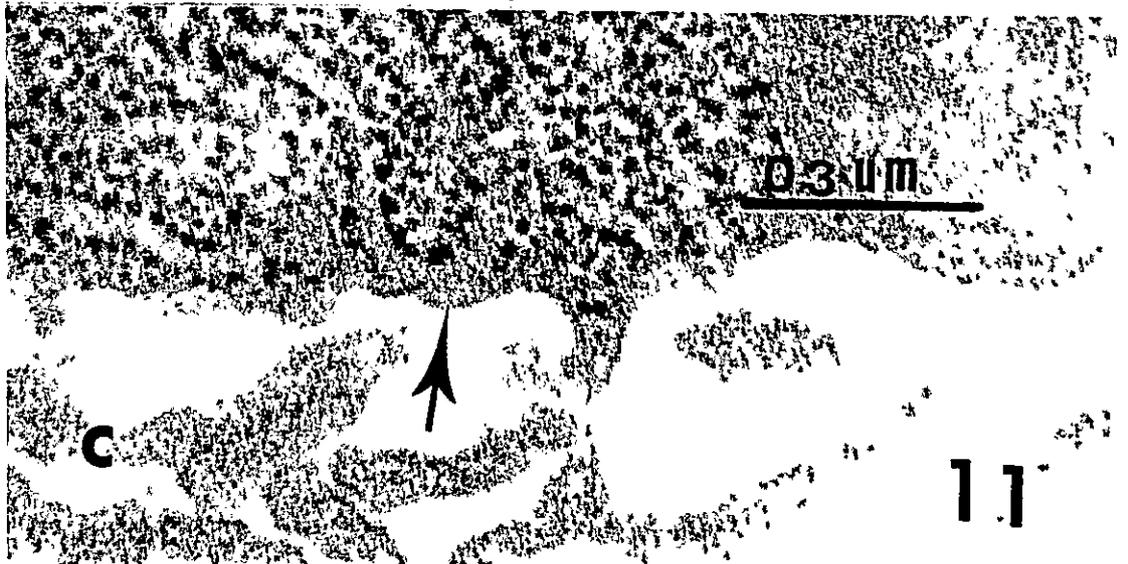
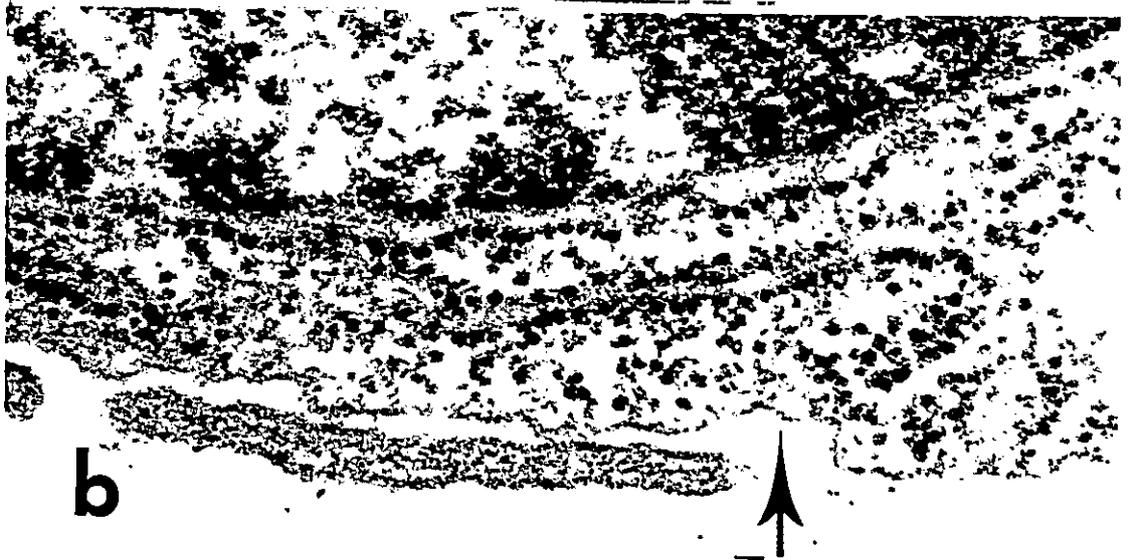
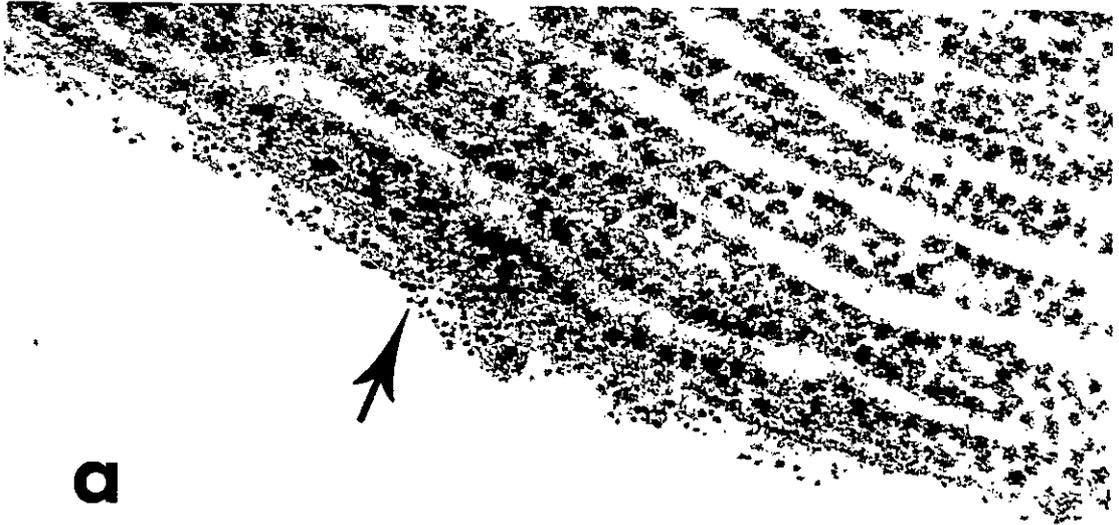
Identificación de residuos de manosa y/o glucosa. En la Fig. 11-a se muestra parte de la superficie basal de una célula acinar incubada con ConA-Fer. Se observa una gran cantidad de partículas de ferritina, distribuidas en forma continua y formando una capa de aproximadamente 30 nm de espesor. Esta distribución sugiere que los receptores de Con-A que pertenecen a glicoproteínas o glicolípidos de la membrana plasmática se disponen en varios niveles. Esta imagen se observó tanto cuando la incubación de los acinos con la ConA-Fer se hizo a 20°C como cuando se realizó a 37°C. En 11-b y c se muestra la superficie basal después de una incubación

## FIGURA 11

### IDENTIFICACION DE RESIDUOS DE MANOSA Y/O GLUCOSA EN LA SUPERFICIE BASAL DE CELULAS NO ESTIMULADAS

- a) Los acinos aislados se incubaron en Con-A/Fer. Las partículas de ferritina ( $\uparrow$ ) se distribuyen en forma continua en toda la superficie basal, ocupando un espesor aproximado de 30 nm.
  
- b) Los acinos se preincubaban con  $\alpha$ -D-manosidasa como se describe en Materiales y Métodos. Luego se incuban con Con-A/Fer. La acción de la enzima eliminó totalmente la reactividad de Con-A por su receptor.
  
- c) Antes de incubar los acinos, se mezcló Con-A/Fer con  $\alpha$ -D-manosa durante 30 minutos. Esta mezcla se agregó luego a los acinos. Al igual que en c no se observó reactividad a Con-A.

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



previa con manosidasa o manosa 0.1 M, respectivamente. Ambos tratamientos eliminaron la reactividad de la superficie basal por la Con-A, lo que sugiere que los receptores identificados por esta lectina corresponden a  $\alpha$ -D-manosa.

Identificación de residuos de ácido siálico y/o N-acetilglucosamina.

La lectina empleada en esta identificación fue la aglutinina de germen de trigo (WGA) unida covalentemente a ferritina (WGA-Fer), que se incubó a 20°C con acinos aislados y no fijados.

En la Fig. 12-a se muestra una parte de la superficie basal de una célula acinar incubada con WGA-Fer. Las partículas de ferritina se encuentran distribuidas en parches a lo largo de esta superficie; se observa también gran reactividad en las digitaciones basales. Cuando la incubación de acinos con lectina se realizó a 4°C se obtuvo un resultado similar (no mostrado).

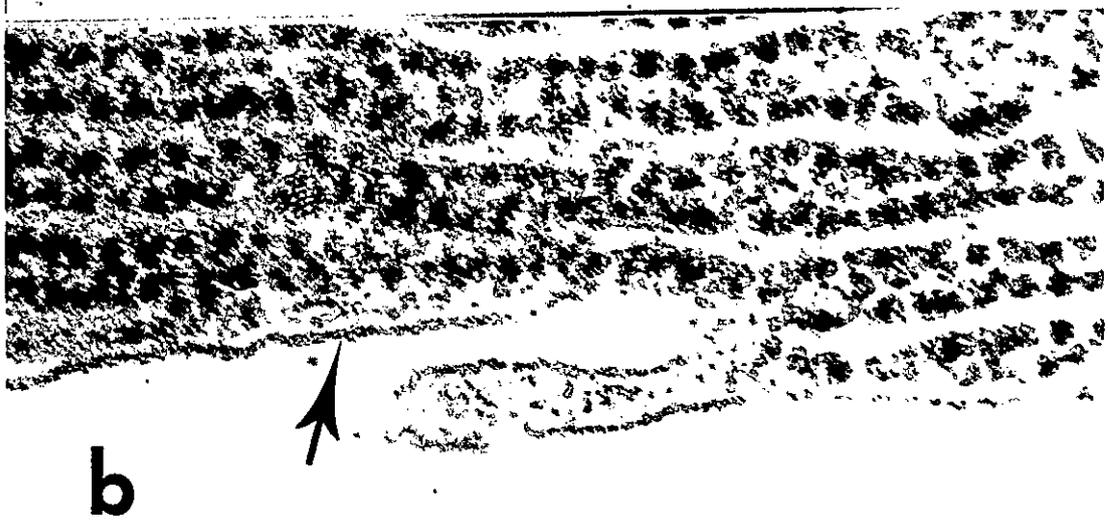
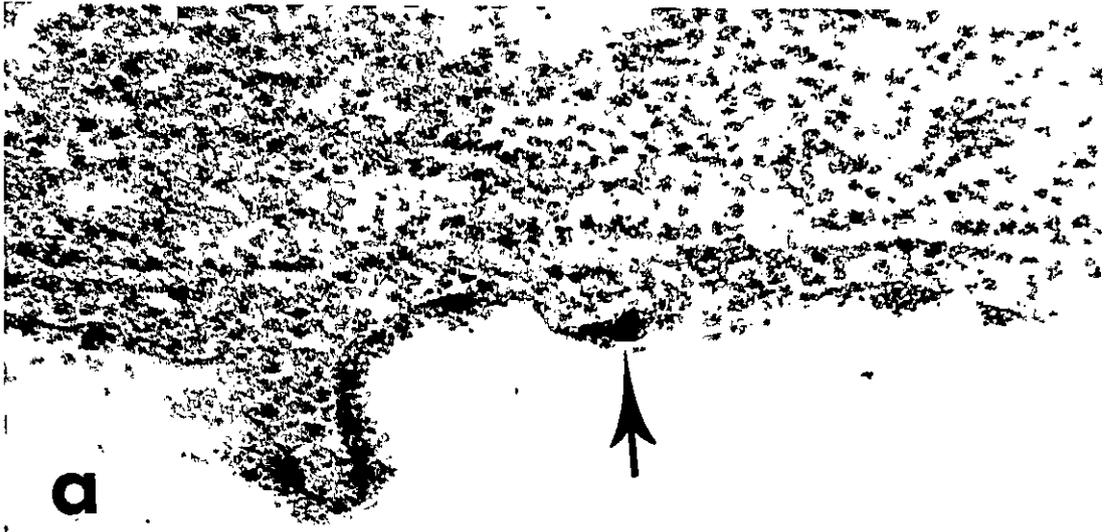
En 12-b y c se muestra la superficie basal de células acinares que se incubaron con neuraminidasa, o con ácido siálico 0.1 M, respectivamente. En ambos casos hay pérdida de la reactividad, a WGA, lo que sugiere que los receptores que reconoce esta lectina en la superficie basal de estas células corresponde a residuos de ácido siálico.

FIGURA 12

IDENTIFICACION DE RESIDUOS DE ACIDO SIALICO Y/O N - ACETIL  
GLUCOSAMINA EN LA SUPERFICIE BASAL DE CELULAS NO ESTIMULADAS

- a) Acinos de parótidas no estimuladas se incubaron con WGA-Fer. Las partículas de ferritina (†) se encuentran distribuidas en parches.
- b) Acinos de parótidas no estimulados se pre-incubaron con neuraminidasa. Luego se incubaron en WGA-Fer. Se observa ausencia total de partículas de ferritina.
- c) Se mezcló WGA-Fer con ácido siálico 0.1 M por 30 minutos. Esta mezcla se agregó a los acinos de parótidas no estimulados. Se observa ausencia total de partículas de ferritina.

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



El hecho que se observe igual distribución de receptores para WGA a 4°C y a 20°C podría indicar, que las glicoproteínas o glicolípidos que contienen los residuos de ácido siálico se encontrarían sometidos a restricciones de difusión lateral. Esto podría deberse, entre otras posibilidades, a interacciones entre las moléculas que portan los receptores y/o interacciones de éstas moléculas con elementos del citoesqueleto. Otro hecho interesante es que no se observan vesículas endocíticas; por lo tanto, la distribución en parches de ácido siálico no sería consecuencia de una pérdida localizada de receptores de WGA. Tampoco se puede descartar que en las condiciones de incubación a 4°C, se establezcan nuevas interacciones entre glicoproteínas pasando de uno a otro estado de parche.

Caracterización citoquímica de la superficie basal de células acinares estimuladas a secretar *in vivo*. Se utilizó un agonista  $\beta$ -adrenérgico, el isoproterenol, en una dosis 1.5 nmoles por gr de peso corporal (dosis baja) y un agonista colinérgico, la pilocarpina, en una dosis de 0.27  $\mu$ moles por gr de peso corporal. Ambas drogas estimulan la secreción de aproximadamente el 50% de  $\alpha$ -amilasa, enzima contenida en los gránulos de secreción de las células acinares de parótida de ratón (Santos y Galanti, 1978; Sans y Galanti, 1975 y 1979).

Grupos de 8 animales se inyectan con las drogas por separado y se sacrificaron 2, 6 y 24 hrs después. Se diseccionó parótidas y se aislaron los acinos. La detección citoquímica de manosa y de ácido siálico en la superficie basal de células acinares se realizó en acinos aislados.

Modificaciones de la reactividad de residuos de manosa. La Fig. 13 muestra los resultados obtenidos después de incubar los acinos obtenidos de animales estimulados a secretar, con ConA-Fer. Isoproterenol en dosis baja provoca pérdida total de reactividad en la superficie basal de las células acinares, 2 y 6 hrs después de la estimulación (Figs. 13-a y b). A las 24 hrs se observa una imagen similar al control (Fig. 13-c). Resultados similares se obtuvieron cuando se inyectó pilocarpina a los ratones. La pérdida de reactividad con ConA-Fer después de estimular secreción puede interpretarse como eliminación de residuos de manosa de la superficie basal, en mascaramiento en la membrana ó internalización de receptores.

Esta última posibilidad es poco probable por cuanto no se observa vesículas endocíticas con la lectina. Considerando que se ha observado pérdida de carbohidratos neutros de una fracción enriquecida en membrana plasmática obtenida de parótidas de ratones estimulados a secretar (López y Galanti, 1976), los resultados observados con ConA-Fer pueden

FIGURA 13

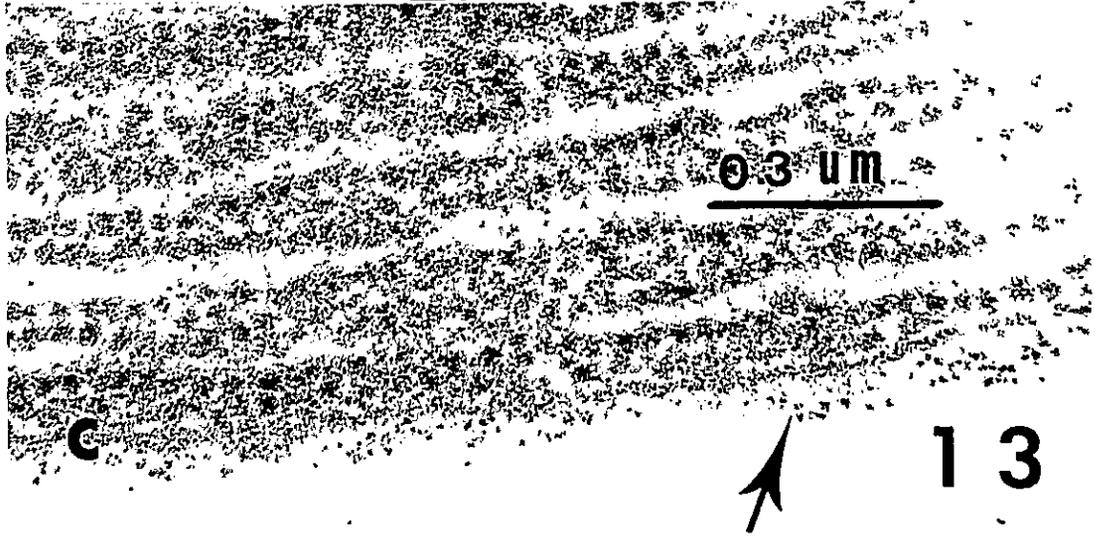
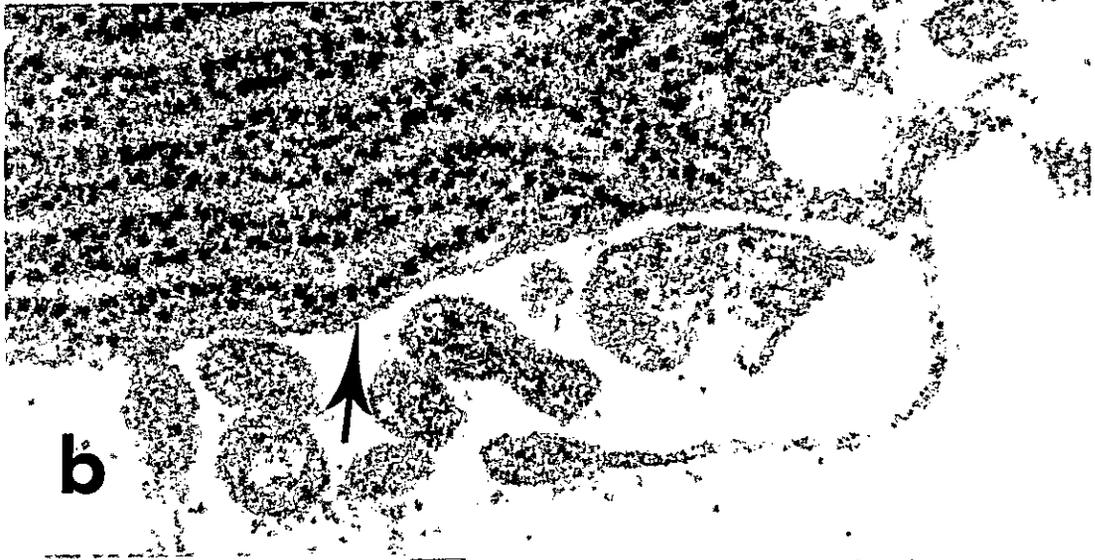
MODIFICACIONES DE LA REACTIVIDAD A Con-A DE LA SUPERFICIE  
BASAL DE CELULAS ACINARES DE PAROTIDAS ESTIMULADAS *IN VIVO*  
CON IPR: SECRECION

Acinos provenientes de parótidas estimuladas *in vivo* con IPR 1.5 nmoles/g de p.c. a secretar, se incubaron con Con-A/Fer 2, 6, y 24 hrs después de la estimulación.

a y b) Dos y seis hrs después de la estimulación a secretar se observa una ausencia total de reactividad de Con-A por los residuos de manosa en la superficie basal de células acinares.

c) 24 hrs después de la estimulación a secretar, se observa que las partículas de ferritina se distribuyen en forma continua, en la superficie basal de las células acinares.

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento. Resultados similares se obtuvieron cuando el agonista empleado fue PIL 0.27  $\mu$ moles/g de p.c. Estos resultados no se muestran.



indicar pérdida de manosa de la superficie basal durante el período temprano de la exocitosis.

Modificaciones en la reactividad de los residuos de ácido siálico. En la Fig. 14 se muestra que una dosis de isoproterenol que induce sólo secreción no modifica la reactividad de la superficie basal a WGA-Fer, 2 y 6 hrs después de aplicado el estímulo. Sin embargo, los receptores no se encuentran en parches sino distribuidos a lo largo de la superficie basal (Figs. 14-a y b). Aparentemente, la reactividad es mayor que la de controles no estimulados. A las 24 hrs después de aplicado el estímulo, la situación es similar a la encontrada en la superficie de células no estimuladas (Fig. 14-c).

Este aumento probable en la reactividad podría ser consecuencia de la pérdida de residuos de manosa, hecho apoyado por los resultados obtenidos con ConA-Fer, dejando más residuos de ácido siálico libres. Otra posibilidad es que la exocitosis inducida por este agonista provoque incorporación a la membrana de nuevos componentes, que llevan ácido siálico en su estructura. La redistribución de receptores observada se discutirá más adelante.

El efecto de pilocarpina sobre la reactividad de la superficie basal a WGA, se muestra en la Fig. 15. A las

FIGURA 14

MODIFICACION EN LA REACTIVIDAD DE WGA DE LA SUPERFICIE BASAL  
DE CELULAS ACINARES DE PAROTIDAS ESTIMULADAS *IN VIVO* CON IPR:  
SECRECION

Acinos provenientes de parótidas estimuladas *in vivo* con IPR 1.5 nmoles/g de p.c. a secretar, se incubaron con WGA-Fer. 2, 6 y 24 hrs después de la estimulación.

a y b) 2 y 6 hrs después de la estimulación a secretar se observa partículas de ferritina distribuidas en forma continua sobre la superficie basal de estas células, ocupando un espesor aproximado de 40 nm desde la membrana plasmática.

c) 24 hrs después de la estimulación a secretar, la superficie basal presenta las partículas de ferritina distribuidas en parches.

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



2 hrs, y aún más notablemente a las 6 hrs, después de administrado este agonista, se observa un aumento aparente de la reactividad a WGA en las microvellosidades basales, presentando cúmulos de partículas de ferritina. El resto de la superficie basal presenta menor reactividad aparente que las células estimuladas con la dosis baja de isoproterenol (Figs. 15-a y b). A las 24 hrs de aplicado el estímulo, la reactividad de la superficie basal regresa a la situación control pero las microvellosidades presentan un número de partículas aparentemente mayor a la de células no estimuladas (Fig. 15-c). El aumento aparente de la reactividad de la superficie basal a WGA-Fer después de inducir secreción con pilocarpina, está de acuerdo con el aumento en el contenido de ácido siálico observado en membranas aisladas de parótidas de ratones estimulados con este agonista (López y Galanti, 1976).

Caracterización citoquímica de la superficie basal de células estimuladas a secretar y a proliferar *in vivo*. Cuando se administra una dosis de isoproterenol de 0.45  $\mu$ moles por gr de peso corporal (dosis alta), se observa secreción masiva de las células acinares 2 hrs después de aplicado el estímulo, e inducción de la síntesis de ADN, a partir de la hora 16.

FIGURA 15

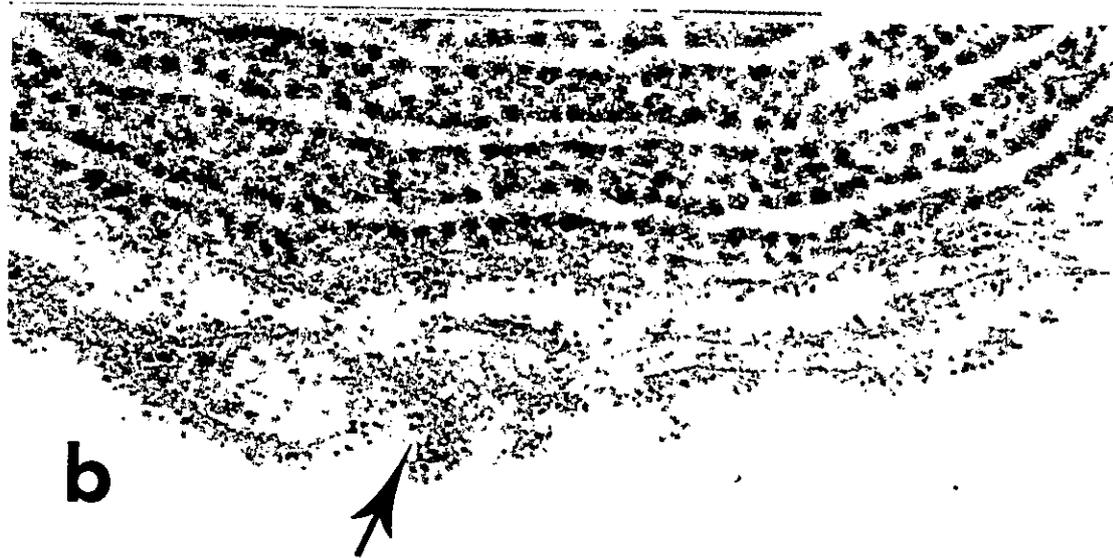
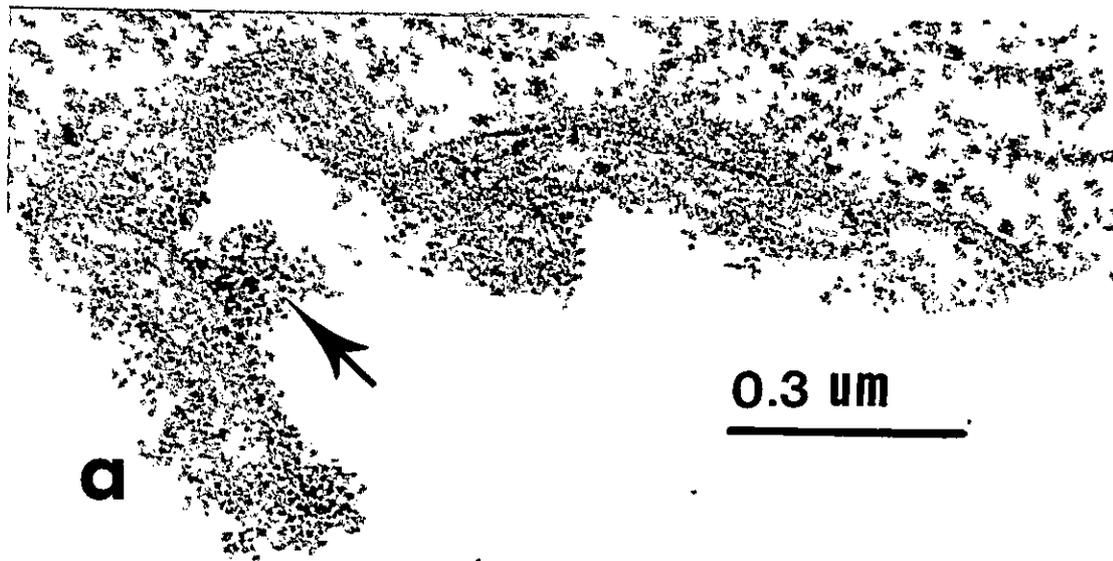
MODIFICACION EN LA REACTIVIDAD DE WGA DE LA SUPERFICIE BASAL  
DE CELULAS ACINARES DE PAROTIDAS ESTIMULADAS *IN VIVO* CON PIL:  
SECRECION

Acinos proveniente de parótidas estimuladas *in vivo* con PIL 0.27  $\mu$ moles/g de p.c. a secretar, se incubaron con WGA-Fer, 2, 6 y 24 hrs después de la estimulación.

a y b) 2 y 6 hrs después de la estimulación a secretar se observa partículas de ferritina formando conglomerados en las digitaciones basales ( $\dagger$ ). En el resto de la superficie basal se distribuye en forma continua.

c) 24 hrs después de la estimulación a secretar, la superficie basal recupera su distribución en parche ( $\dagger$ ). Las digitaciones basales presentan un incremento aparente en el número de partículas de ferritina comparada con las digitaciones basales de células no estimuladas.

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



Se estudió la reactividad de la superficie basal de las células acinares a ConA-Fer y WGA-Fer después de aplicar la dosis alta de IPR. Por otra parte, se estimó la cantidad de ácido siálico en la superficie basal de estas células, por unión a WGA-<sup>3</sup>H y por determinación química de ácido siálico liberado por neuraminidasa.

Modificaciones en la reactividad de los residuos de manosa.

En la Fig. 16 se observa que 2 hr después de administrado el isoproterenol en dosis alta, la superficie basal de los acinos aislados muestra una pérdida aparente de reactividad a la ConA-Fer, por cuanto las partículas de ferritina se encuentran distribuidas en forma continua, en estrecha relación con la membrana plasmática (Fig. 16-a). Se ha perdido la distribución de las partículas de ferritina en varios planos sobre la membrana plasmática, observada en controles no estimulados. Una situación muy similar se observa en acinos obtenidos de ratones 6 hrs después de inyectado el IPR (Fig. 16-b), para retornar a la condición control a las 24 hrs (Fig. 16-c). Considerando que 2 y 6 hrs después de administrada la dosis baja de este agonista, se pierde la reactividad con Con-A (Figs. 12-a y b), probablemente por eliminación de los residuos de manosa, la reactividad observada 2 y 6 hr después de inyectar IPR en dosis alta podría corresponder a nuevos residuos de manosa.

FIGURA 16

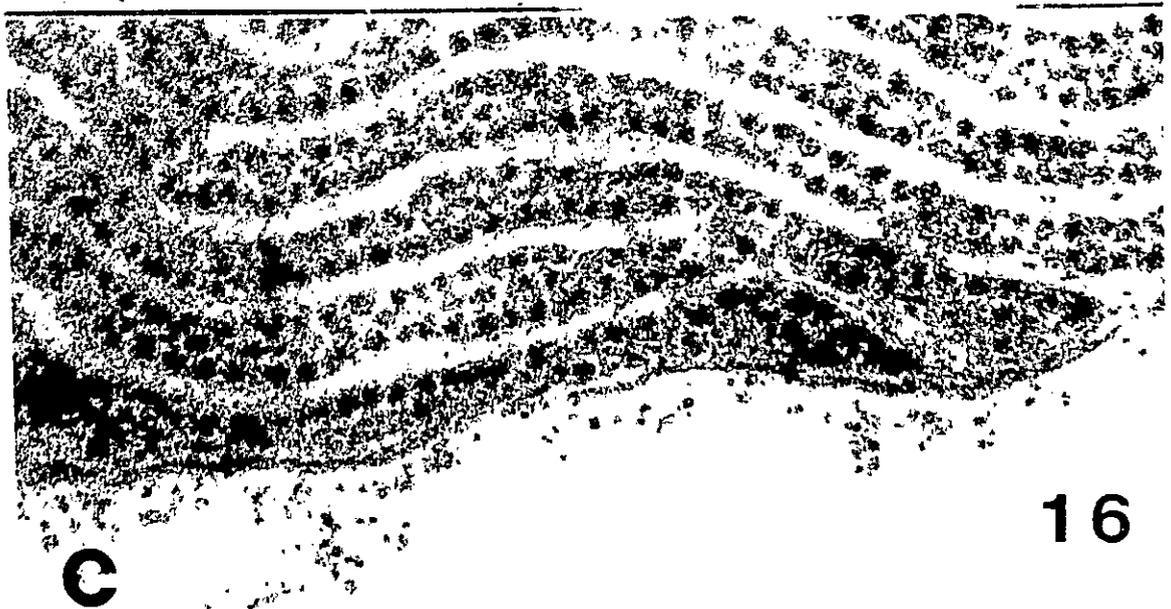
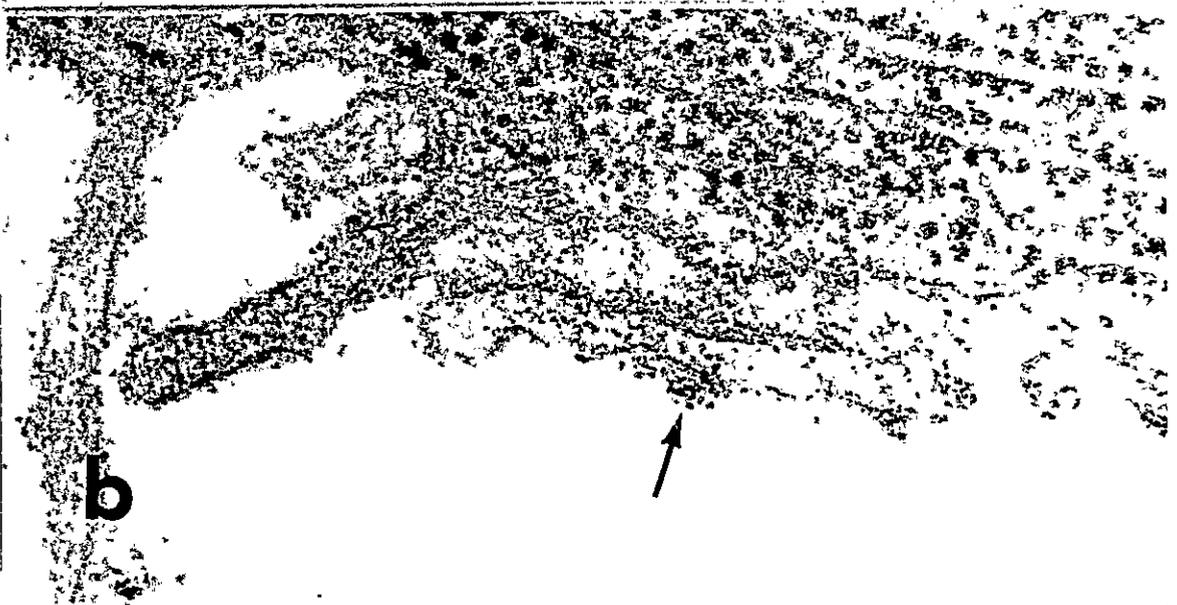
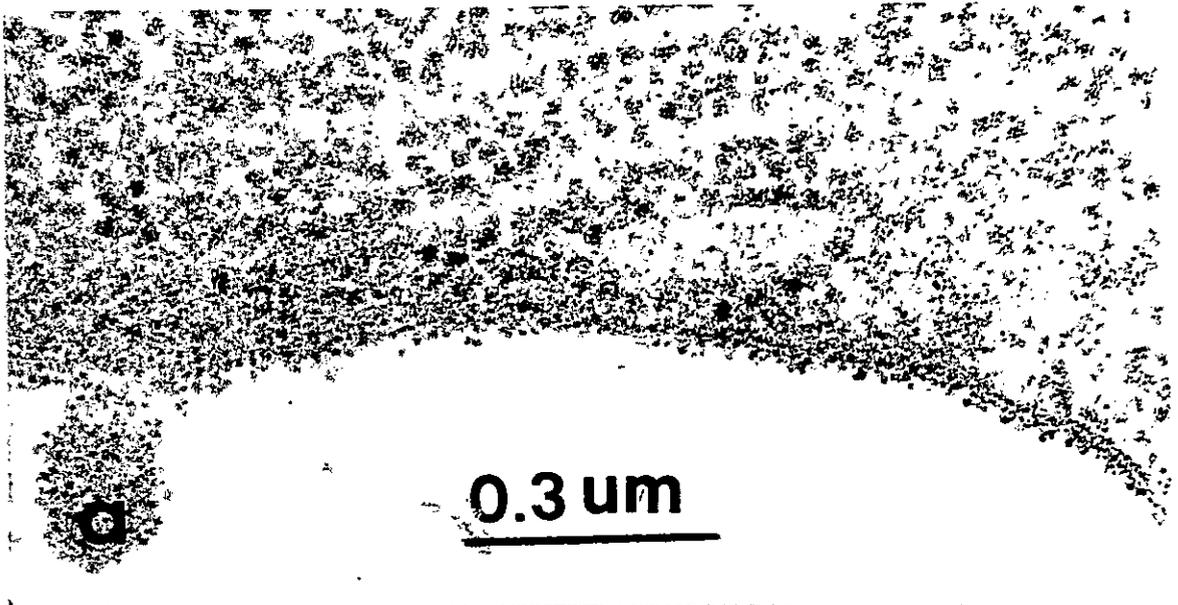
MODIFICACION EN LA REACTIVIDAD A Con-A DE LA SUPERFICIE BASAL  
DE CELULAS ACINARES ESTIMULADAS *IN VIVO* CON IPR: SECRECION Y  
PROLIFERACION CELULAR

Acinos provenientes de parótidas estimuladas *in vivo* 0.45  
 $\mu$ moles/g de p.c. con IPR, a secretar y a proliferar, se incu-  
baron con Con-A-Fer, 2, 6 h 24 hrs después de la estimulación,

a y b) 2 y 6 hrs después de la estimulación a secretar y pro-  
liferar, la superficie basal de las células acinares  
muestran partículas de ferritina en aposición con la  
membrana plasmática. Pequeñas agrupaciones de partí-  
culas se encuentran en las digitaciones (†).

c) 24 hrs después de la estimulación a secretar y proli-  
ferar en la superficie basal de estas células, se dis-  
tingue partículas de ferritina distribuidas en forma  
continua y en varios planos sobre la membrana plasmá-  
tica.

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



### Modificaciones en la reactividad de los residuos de ácido

siálico. En la Fig. 17-a se observa que 2 hr después de aplicar IPR en dosis que inducen secreción y estimulación de síntesis de ADN, la reactividad de la superficie basal a WGA es aparentemente menor a la observada en células no estimuladas y las partículas de ferritina se redistribuyen uniformemente a lo largo de la superficie basal. La situación es casi idéntica a las 6 hr después de administrado el estímulo (Fig. 17-b). A las 24 hr, la reactividad de la superficie basal a WGA es similar a la de células no estimuladas. Considerando los resultados de López y Galanti (1976), quienes demostraron pérdida de ácido siálico en membranas aisladas de parótida de ratones, 2 hr después de estimulación con una dosis alta de IPR, la caída aparente en la reactividad de la superficie basal a WGA podría deberse a pérdida de ácido siálico. Esto a su vez puede llevar a exponer residuos de manosa subterminales, que explicaría la reactividad a ConA-Fer de la superficie basal de acinos aislados de ratones estimulados con la dosis alta de IPR.

### Especificidad de la reactividad a lectinas en superficie

basal de células acinares estimuladas a secretar y proliferar.

Para probar que la reactividad a ConA-Fer y a WGA de la superficie basal de células acinares de parótidas de ratones estimulados con una dosis alta de IPR es debida a

## FIGURA 17

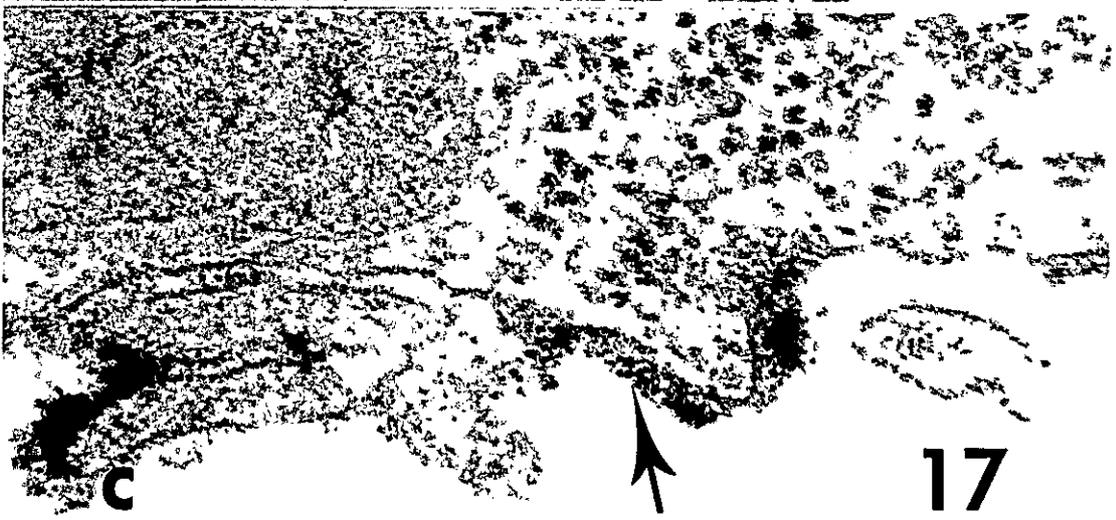
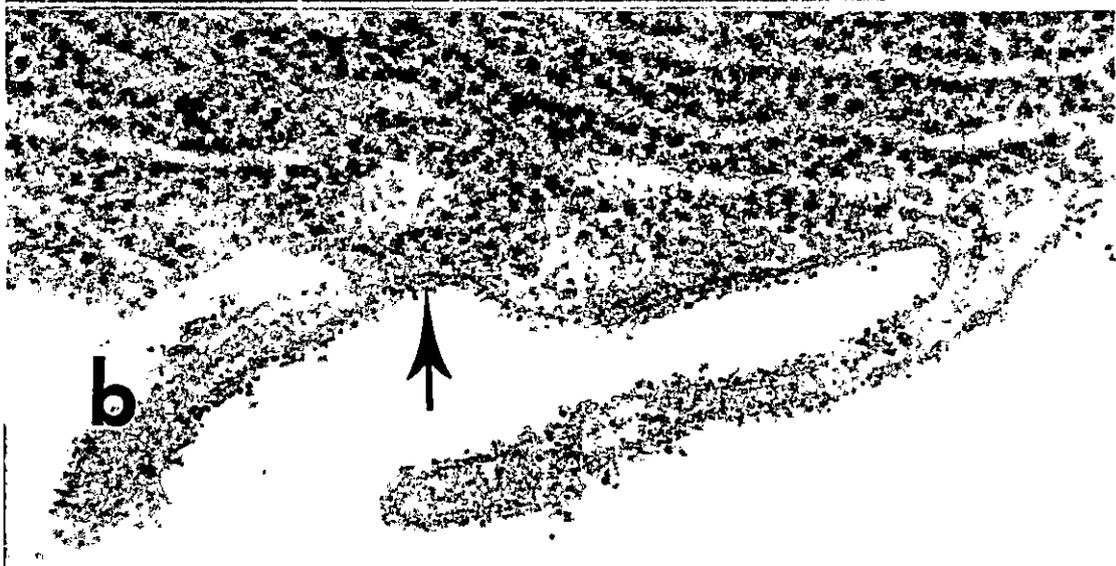
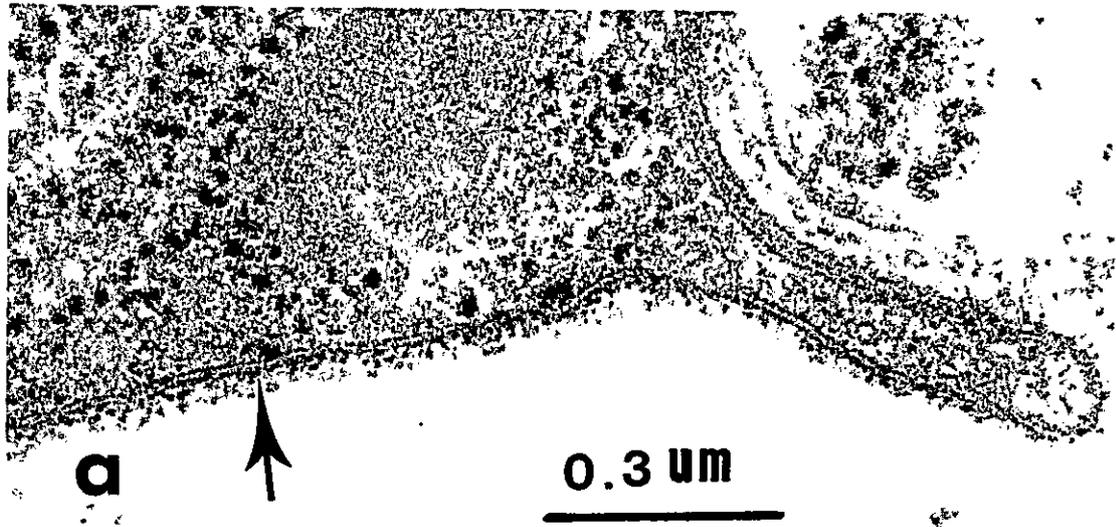
### MODIFICACION EN LA REACTIVIDAD A WGA DE LA SUPERFICIE BASAL DE CELULAS ACINARES ESTIMULADAS *IN VIVO* CON IPR: SECRECION Y PROLIFERACION CELULAR

Acinos provenientes de parótidas estimuladas *in vivo* con IPR 0.45  $\mu$ moles/g de p.c. a secretar y proliferar, se incubaron con WGA-Fer, 2, 6 y 24 hrs después de la estimulación.

a y b) 2 y 6 hrs después de la estimulación a secretar y a proliferar, la superficie basal de las células acinares, presentan partículas de ferritina ( $\uparrow$ ) distribuidas en forma continua y muy próximas a la membrana plasmática.

c) 24 hrs después de la estimulación a secretar y a proliferar, la superficie basal de las células acinares presenta las partículas de ferritina ( $\uparrow$ ) distribuidas en parches.

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



manosa y ácido siálico respectivamente, se trató estos acinos con manosidasa y neuraminidasa, previo a su incubación con lectinas. En la Fig. 18-a se observa que la neuraminidasa elimina totalmente la reactividad de la superficie basal a WGA. Resultados similares se obtuvieron al tratar estos acinos con manosidasa e incubarlos con ConA-Fer (Fig. 18-b).

Determinación del contenido de ácido siálico en acinos de células estimuladas a secretar y proliferar

Los estudios citoquímicos mostraron una disminución o aumento aparente de ácido siálico en la superficie basal de las células acinares, dependiendo del tratamiento aplicado. Por lo tanto, se estimó necesario implementar técnicas cuantitativas para medir estas variaciones del monosacáridos.

Por determinación química de ácido siálico liberado de acinos tratados con neuraminidasa. Grupos de 4 animales se inyectan con las drogas por separado y se sacrifican 2 hr después. Se disecó parótida y se aislaron los acinos; éstos fueron tratados con neuraminidasa. Se midió el ácido siálico liberado y el remanente en los acinos.

FIGURA 18

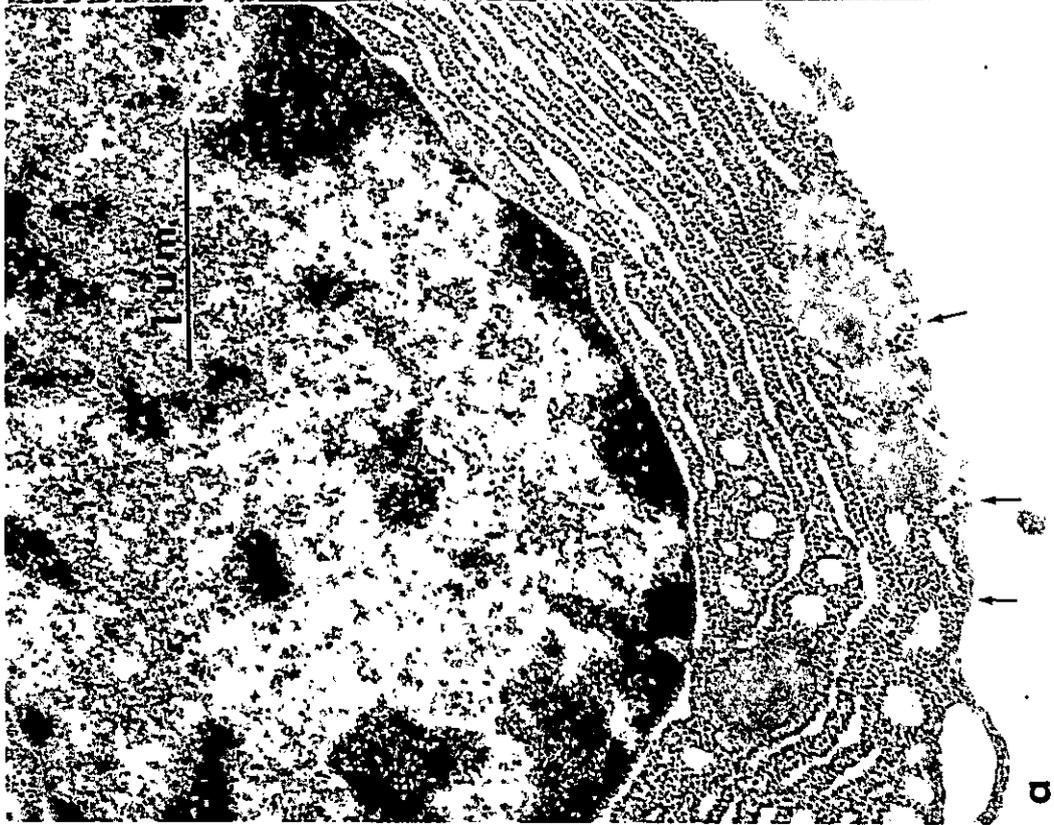
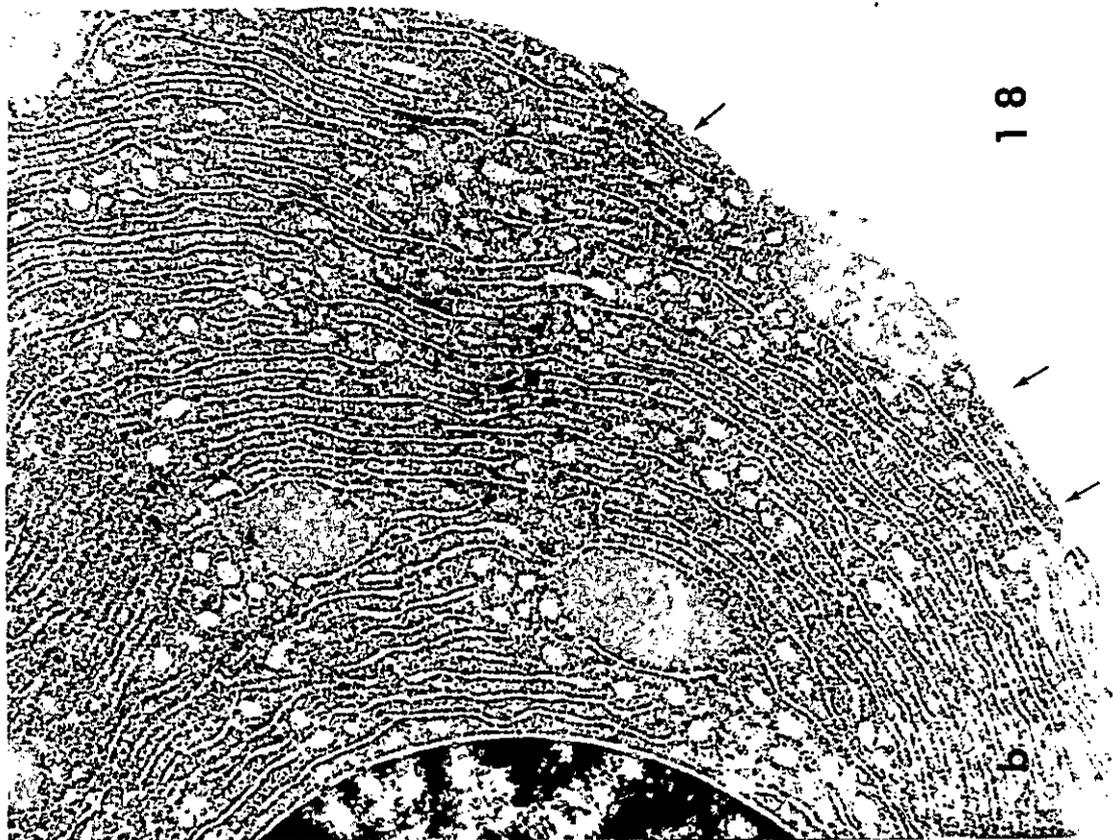
ESPECIFICIDAD DE LA REACTIVIDAD A LECTINAS EN SUPERFICIE BASAL  
DE CELULAS ACINARES ESTIMULADAS A SECRETAR Y PROLIFERAR

Acinos provenientes de parótidas estimuladas *in vivo* con IPR 0.45  $\mu$ moles/g de p.c., se trataron 2 hrs después de aplicado el estímulo con neuraminidasa ó con  $\alpha$ -D-neuraminidasa y luego se incubaron con WGA-Fer.

a) 2 hrs después de la estimulación a secretar y proliferar, la superficie basal de células acinares muestran ausencia total de reactividad a WGA después del tratamiento de los acinos con neuraminidasa.

b) 2 hrs después de la estimulación a secretar y proliferar, la superficie basal de células acinares presentan falta total de reactividad a Con-A después del tratamiento de los acinos con neuraminidasa.

Ambas microfotografías tienen el mismo aumento.



Los resultados se muestran en la Tabla II. Se observa que la cantidad de ácido siálico liberado por neuraminidasa de acinos provenientes de glándulas no estimuladas es 7 veces mayor que la cantidad liberada de acinos provenientes de glándulas estimuladas a secretar y proliferar (dosis alta de IPR). Por el contrario, acinos provenientes de glándulas estimuladas sólo a secretar (dosis baja de IPR ó PIL), muestran un aumento en el contenido de ácido siálico de aproximadamente un 30%. En todas las condiciones analizadas, la neuraminidasa empleada hidrolizó más del 95% del ácido siálico celular, sin modificar mayormente la ultraestructura de la célula (Fig. 18-a).

Por unión de WGA tritiada a acinos aislados de parótidas. A licuotas de acinos aislados se incubaron directamente en WGA-<sup>3</sup>H ó en WGA-<sup>3</sup>H preincubado con un inhibidor competitivo (ácido siálico ó N-acetilglucosamina). Otra suspensión de acinos fue pretratada con neuraminidasa antes de su incubación con la lectina radioactiva.

Los resultados se muestran en la Tabla III. La inhibición de la unión de la lectina a los acinos producidos por ácido siálico fue de un 82,6%, mientras que N-acetilglucosamina sólo redujo en un 3.8% de esta unión. Al mismo tiempo, neuraminidasa redujo la unión de lectina en aproximadamente

TABLA II

CONTENIDO DE ACIDO SIALICO EN ACINOS DE PAROTIDAS DE RATON.  
EFECTO DE ISOPROTERENOL Y PILOCARPINA

Tratamiento	µg de ácido siálico liberado	
	mg ADN celular	%
Control (no estimulado)	487.7 ± 2.28	100
IPR 0.45 µmoles/g de p.c.	69.4 ± 0.96	14.2
IPR 1.5 nmoles/g de p.c.	669.0 ± 24.7	137.2
PIL 0.27 µmoles/g de p.c.	586.2 ± 13.2	120.2

p.c. = peso corporal

PIL = Pilocarpina

IPR = Isoproterenol

Los acinos aislados se incubaron con neuraminidasa, el ácido siálico liberado se determinó en el sobrenadante y el ácido siálico no hidrolizado junto con el ADN celular se midió en el sedimento. El ácido siálico no liberado corresponde a no más del 5% del ácido siálico determinado en acinos no estimulados (N = 2, determinaciones en triplicado). Se midió la actividad enzimática endógena para cada tratamiento; la cantidad de ácido siálico liberado corresponde aproximadamente al 40% de los valores obtenidos para cada situación experimental.

95%. Esto demuestra que la WGA se une al ácido siálico presente en estas células.

Acinos obtenidos de glándulas estimuladas *in vivo* a proliferar y secretar mediante isoproterenol, presentan al cabo de 2 hr un descenso de un 75% en la unión a WGA tritiada, lo que sugiere pérdida de un porcentaje equivalente de residuos de ácido siálico terminales. Por el contrario, acinos obtenidos de parótidas estimuladas sólo a secretar, presentan un incremento significativo en la unión a WGA-<sup>3</sup>H. Estos resultados confirman y extienden la observación efectuada con técnicas citoquímicas y las determinaciones efectuadas en membranas aisladas (López y Galanti, 1976). Parece evidente que el ácido siálico expuesto en la superficie de las células acinares aumenta cuando éstas se estimulan solo a secretar y disminuye drásticamente cuando se induce exocitosis masiva y estimulación de la síntesis de ADN nuclear.

#### Detección de residuos de manosa subterminales en la superficie basal de células acinares

Los resultados obtenidos del análisis citoquímico mostrados en esta tesis, sugieren que la estimulación *in vivo* de las células acinares por isoproterenol provoca pérdida de residuos de monosacáridos terminales desde su superficie basal.

TABLA III

UNION DE N-(ACETIL-<sup>3</sup>H)-WGA A CELULAS ACINARES. EFECTO DE  
ISOPROTERENOL Y PILOCARPINA

Tratamiento	cpm WGA- <sup>3</sup> H unida a ácido		%
	siálico/100	µg ADN	
Control (no tratado)	88.583 ±	2.708	100
Ac. siálico 0.1 M	15.460 ±	945	17.4
N-acetilgluc. 0.1 M	85.335 ±	3.249	96.6
Neuraminidasa	3.400 ±	N.D.	3.8
IPR 0.45 µmoles/g de p.c.	22.152 ±	1.033	25.0
IPR 1.5 nmoles/g de p.c.	128.556 ±	5.120	145.1
PIL 0.27 µmoles/g de p.c.	109.557 ±	13.191	123.6

WGA-<sup>3</sup>H = aglutinina de germen de trigo tritiada

IPR = isoproterenol

PIL = pilocarpina.

N.D. = no determinado

Los acinos aislados se incubaron con WGA-<sup>3</sup>H por 30 min a 20°C. Después de lavados, se determinó en ellos la radioactividad remanente. Los inhibidores competitivos se preincubaron con la lectina radioactiva por 30 min a 20°C, antes de agregarlos a los acinos. Otra suspensión de acinos se trató con neuraminidasa antes de la incubación con WGA-<sup>3</sup>H. (N = 2, determinaciones en duplicado).

Así, una dosis de isoproterenol que induce exocitosis masiva y estimula la síntesis de ADN nuclear, libera ácido siálico de la superficie, aparentemente exponiendo residuos subterminales de manosa. Por otra parte, estímulos que inducen sólo secreción, incrementan el contenido de ácido siálico en la superficie basal y retira residuos de manosa.

Para probar que la eliminación de ácido siálico de la superficie expone residuos de manosa, se trató con neuraminidasa acinos provenientes de animales no tratados y de ratones estimulados sólo a secretar. Posteriormente, se incubaron con ConA-Peroxidasa para identificar residuos de manosa. Paralelamente, se investigó la reactividad a esta lectina en acinos provenientes de glándulas no estimuladas ó estimuladas con IPR 0.45  $\mu$ moles/g de peso corporal ó 1.5  $\mu$ moles/g de peso corporal.

En la Fig. 19-a se muestra la reactividad a Con-A/ peroxidasa de la superficie basal de células no estimuladas. La superficie se observa cubierta de una capa continua de material tenuemente denso a los electrones. La Fig. 19-b corresponde al control de especificidad de la reacción, donde se empleó  $\alpha$ -D-manosa 0.1 M previamente incubado con la Con-A por 30 minutos. La superficie basal de estas células no presenta producto de actividad peroxidasa. Aparecen en esta figura glóbulos rojos como control positivo interno. Estos tienen actividad pseudoperoxidasa y reducen fuertemente a la

3,3-diaminobenzidina en las condiciones experimentales empleadas.

La Fig. 19-c muestra los resultados obtenidos en acinos 2 hr después de estimulación solo a secretar (IPR dosis baja). La superficie basal de las células acinares no presenta el producto de la actividad peroxidásica. Por lo tanto, empleando una técnica diferente a la Con-A/Ferritina se obtiene el mismo resultado (eliminación de residuos de manosa de la superficie basal de células acinares estimuladas sólo a secretar).

En la Fig. 19-c se muestra los resultados obtenidos con acinos 2 hr después de su estimulación con la dosis alta de IPR. La superficie basal de las células acinares presenta una cubierta continua de material muy denso a los electrones. Esta misma situación se aprecia cuando acinos de parótida proveniente de glándulas no estimuladas son incubados con neuraminidasa (Fig. 19-e). Cuando acinos de parótidas provenientes de animales estimulados con la dosis baja de IPR se preincuban con neuraminidasa antes del tratamiento con ConA-Per, la superficie basal de las células acinares presentan la misma reactividad descrita en la Fig. 19-d (Fig. 19-f).

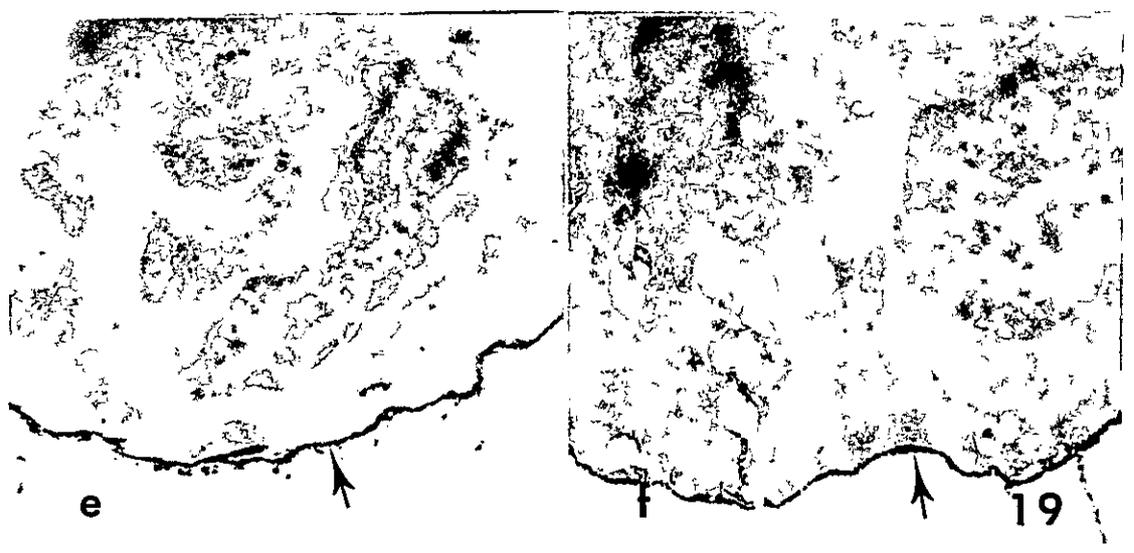
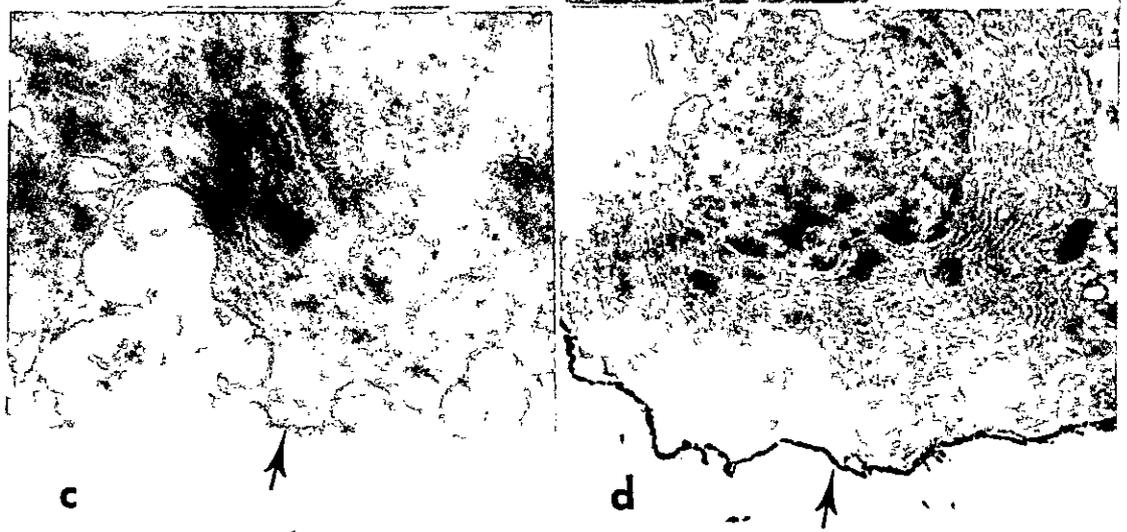
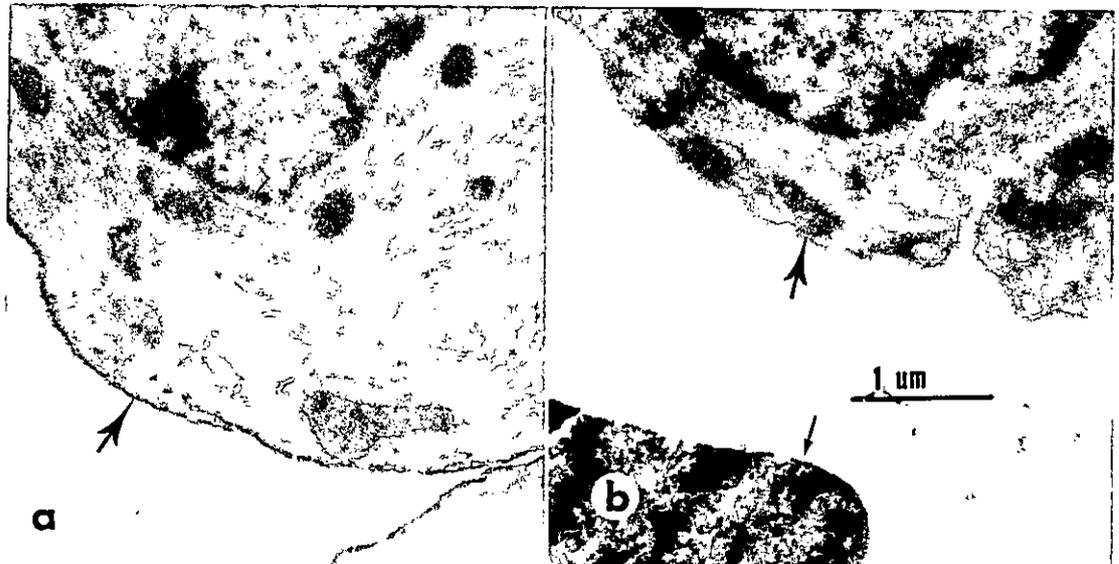
De lo anterior se desprende que la acción de desialilación por el tratamiento con neuraminidasa estaría exponiendo nuevos residuos de manosa reactivos a ConA. Resultados

FIGURA 19

DETECCION DE RESIDUOS DE MANOSA SUBTERMINALES EN LA SUPERFICIE  
BASAL DE CELULAS ACINARES

- a) La superficie basal de células no estimuladas presenta una te  
nue reacción peroxidasa.
- b) La superficie basal de células no estimuladas e incubadas con  
Con-A-manosa, muestra ausencia total de reactividad enzimática.  
Parte de un glóbulo rojo presenta actividad pseudoperoxidasa.
- c) La superficie basal de células estimuladas sólo a secretar  
(IPR dosis baja) no presenta actividad peroxidasa.
- d) La superficie basal de células estimuladas a secretar y a pro  
liferar (dosis alta de IPR) muestra una fuerte zona de activi  
dad peroxidasa.
- e y f) La superficie basal de células no estimuladas (e) ó esti  
muladas sólo a secretar (f) pre-tratadas con neuraminidasa y  
luego incubadas en ConA-Peroxidasa, muestra una reacción muy  
similar a la observada en d).

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



similares se obtienen con acinos provenientes de animales tratados con la dosis alta de IPR, lo que nuevamente indica que este tratamiento retira residuos de ácido siálico de la superficie basal y expone residuos de manosa. Estos resultados se correlacionan con la menor capacidad de estos acinos estimulados a secretar y a proliferar de unir WGA-<sup>3</sup>H, como también con su menor contenido de ácido siálico.

Caracterización citoquímica de la superficie basal de células acinares estimuladas *in vitro*

Reactividad de residuos de manosa. En la Fig. 20-a se muestra parte de la superficie basal de una célula acinar 2 hr después de su estimulación *in vitro* con IPR  $10^{-6}$  M. Tal como se había observado en acinos provenientes de parótidas estimuladas *in vivo* solo a secretar, reactividad a ConA-ferritina desaparece. La Fig. 20-b muestra la reactividad a ConA-Fer obtenida 2 hr después de la estimulación *in vitro* con IPR  $10^{-5}$  M. Se encuentra una disminución aparente de partículas de ferritina, situación similar a lo observado en acinos estimulados *in vivo* a secretar y proliferar. Seis hr después de aplicados estos estímulos *in vivo* se observan imágenes semejantes a las descritas para ambos tratamientos (no mostrado).

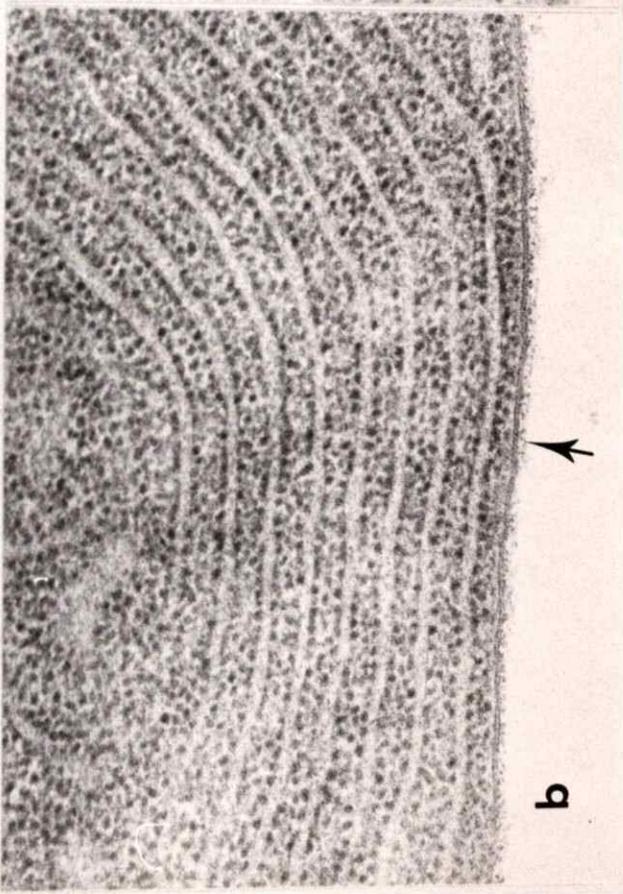
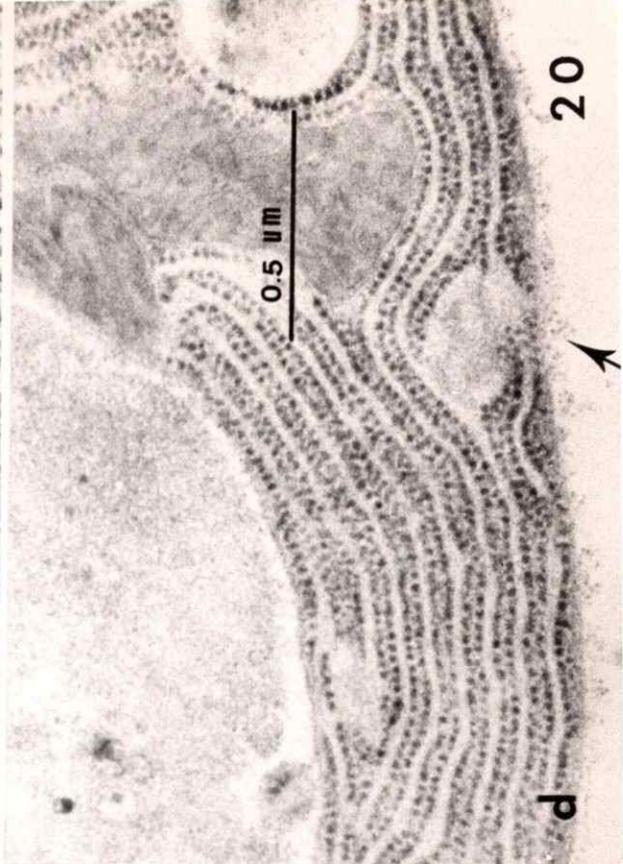
FIGURA 20

REACTIVIDAD DE RESIDUOS DE MANOSA EN LA SUPERFICIE BASAL DE  
CELULAS ACINARES, ESTIMULADAS *IN VITRO* CON IPR O PIL

Acinos estimulados *in vitro* con IPR  $10^{-5}$  M ó  $10^{-6}$  M ó PIL  $10^{-3}$  M se incubaron con ConA-Fer 2, 6 y 24 hrs después de ca da estimulación.

- a) La superficie basal de células acinares estimuladas con IPR  $10^{-6}$  M presenta ausencia de reactividad a Con-A 2 hrs después de la estimulación. 6 hrs después se observa un aspecto similar (no se muestra).
- b) La superficie basal de células acinares estimuladas con IPR  $10^{-5}$  M muestra partículas de ferritina distribuida en forma continua y muy próxima a la membrana plasmática, 2 hrs después de la estimulación. 6 hrs después se encuentra la misma imagen.
- c) La superficie basal de células acinares estimuladas con IPR  $10^{-6}$  M ó  $10^{-5}$  M se presenta a las 24 hrs después de la estimulación con partículas de ferritina distribuida en forma continua y en varios planos sobre la membrana plasmática.
- d) La superficie basal de células acinares estimuladas con PIL  $10^{-3}$  M presenta una distribución continua y en varios planos a las 2, 6 y 24 hrs después de la estimulación.

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



A las 24 hr después de la estimulación *in vitro* con ambos tratamientos, la reactividad a ConA es similar a los controles no tratados (Fig. 20-c). Estos resultados sugieren que la acción del isoproterenol es directa sobre la superficie basal de las células acinares.

Los resultados obtenidos después de incubar los acinos *in vitro* con pilocarpina son sorprendentes. En todos los tiempos analizados, no se observó cambios en la reactividad de la superficie basal de las células acinares respecto al control no estimulado (Fig. 20-d). Este hecho se discutirá más adelante.

Reactividad de residuos de ácido siálico. En acinos incubados *in vitro* con una concentración de IPR  $10^{-6}$  M por 2 hr, se observa un aumento aparente en la reactividad de la superficie basal a WGA-Fer (Fig. 21-a), similar a lo observado después de estimular *in vivo* parótidas con la dosis baja de IPR. Por el contrario, la incubación *in vitro* de acinos con una concentración de IPR  $10^{-5}$  M provoca disminución aparente de la reactividad a WGA-Fer (Fig. 21-b) situación nuevamente homologable a lo observado cuando se estimula parótidas *in vivo* con la dosis alta de IPR. En todos estos casos se observa redistribución de los receptores a lo largo de la superficie.

A las 24 hrs después de estimular acinos con ambas concentraciones de IPR la reactividad a WGA-Fer es aparentemente similar a la de acinos no estimulados pero se pierde la distribución en parche característica de células no estimuladas (Fig. 21-c). Así, las partículas de ferritina se distribuyen formando conglomerados cercanos, de tal forma que dan una imagen de distribución continua, con zonas de mayor intensidad de partículas. Este resultado sugiere que 24 hr de incubación *in vitro* induce ligeros reordenamientos en la superficie basal de células acinares mantenidas en cultivo.

La incubación de acinos aislados con PIL no modifica la reactividad de la superficie basal a WGA-Fer, en ninguno de los tiempos analizados (Fig. 21-d). Estos resultados son similares a los obtenidos cuando se incuban estos acinos con ConA-Fer. Nuevamente se observa que los receptores a WGA se redistribuyen a lo largo de la superficie a las 24 hr después de la estimulación con PIL.

De lo anterior se desprende que el isoproterenol actúa directamente sobre los componentes de la membrana plasmática basal de las células. Por el contrario, los resultados obtenidos con pilocarpina sugieren que esta droga actúa por otro mecanismo.

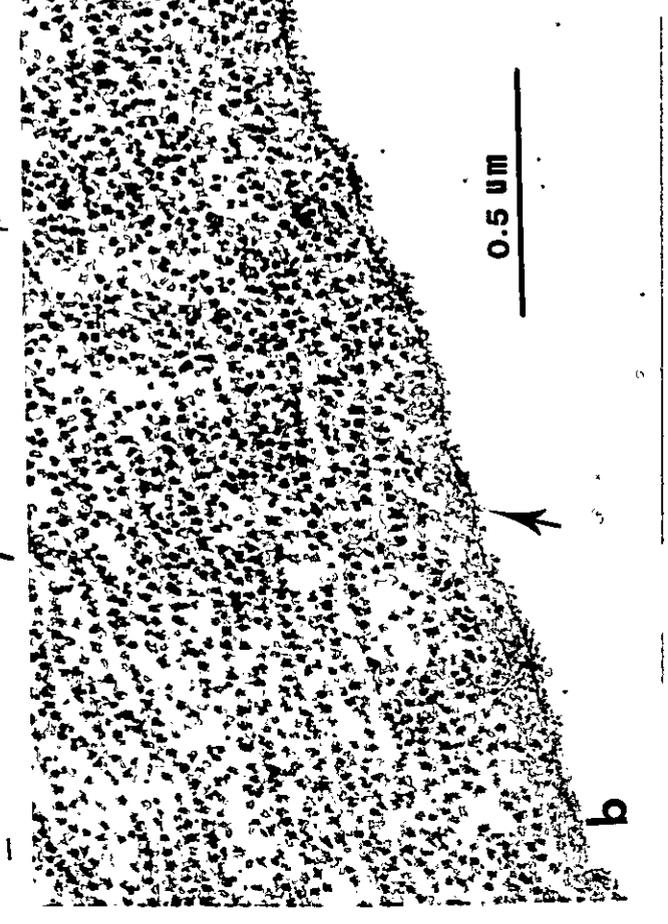
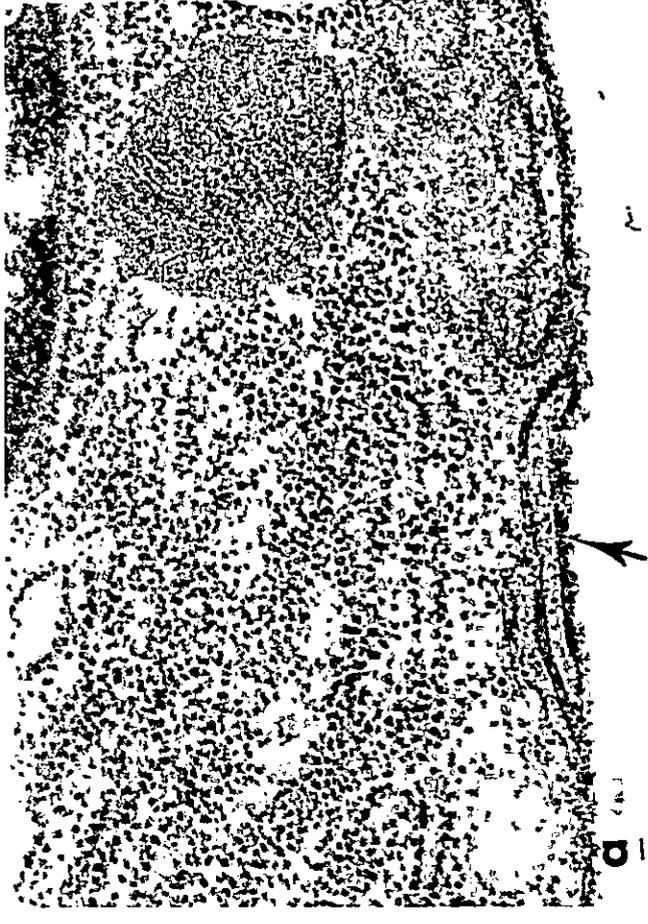
FIGURA 21

REACTIVIDAD DE RESIDUOS DE ACIDO SIALICO EN LA SUPERFICIE  
BASAL DE CELULAS ACINARES, ESTIMULADAS *IN VITRO* CON IPR  
O PIL

Acinos estimulados *in vitro* con IPR  $10^{-5}$  M ó  $10^{-6}$  M ó PIL  
 $10^{-3}$  M se incubaron con WGA-Fer, 2, 6 y 24 hrs después de es-  
timulación,

- a) La superficie basal de células acinares estimuladas con IPR  $10^{-6}$  M 2 hrs después de la estimulación, se observa un aumento aparente en la reactividad a WGA, que se mantiene hasta las 6 hrs (dato que no se muestra).
- b) La superficie basal de células acinares estimuladas con IPR  $10^{-5}$  M muestra una disminución aparente de la reactividad a WGA 2 hrs después de aplicado este agonista. Las partículas de ferritina se distribuyen en forma continua. Esta imagen se observa también a las 6 hrs.
- c) La superficie basal de células estimuladas con IPR  $10^{-5}$  M ó  $10^{-6}$  M ó PIL  $10^{-3}$  M presenta 24 hrs después una distribución de partículas formando conglomerados (†), mostrando tencia a distribución continua.
- d) En la superficie basal de células estimuladas con PIL  $10^{-3}$  M 2 y 6 hrs después de aplicado el estímulo, las partículas de ferritina se encuentran distribuidas en parches (†).

Todas las microfotografías tienen el mismo aumento.



Diferencia de reactividad a lectinas de las superficies  
basal y lateral

Un hecho importante de hacer notar es la reactividad a Con-A ó WGA de la superficie lateral. Así, esta superficie presentó muy baja reactividad a lectinas en células acinares no estimuladas y un patrón de distribución de tipo discontinuo. Esta imagen no sufrió modificaciones con ninguno de los agonistas utilizados (Figs. 22-a y b).

La baja reactividad a lectinas de la superficie lateral podría deberse a menor difusión de las lectinas a dicho compartimento. En general, la superficie lateral y en especial el límite basolateral, se encuentra suficientemente expuesto a los reactivos (Fig. 3-c). Por lo tanto, el hecho que las superficies basal y lateral presentan reactividad diferente de sus residuos expuestos de ácido siálico y manosa, sugiere que ambas superficies representan compartimentos diferentes. Más aún, la superficie lateral no se modifica frente a los estímulos aplicados, situación que parece confirmar cierta independencia de ambas superficies y una acción muy específica de los agonistas empleados sobre la superficie basal.

FIGURA 22

REACTIVIDAD A Con-A Y A WGA DE LA SUPERFICIE LATERAL DE LAS  
CELULAS ACINARES DE PAROTIDA DE RATON

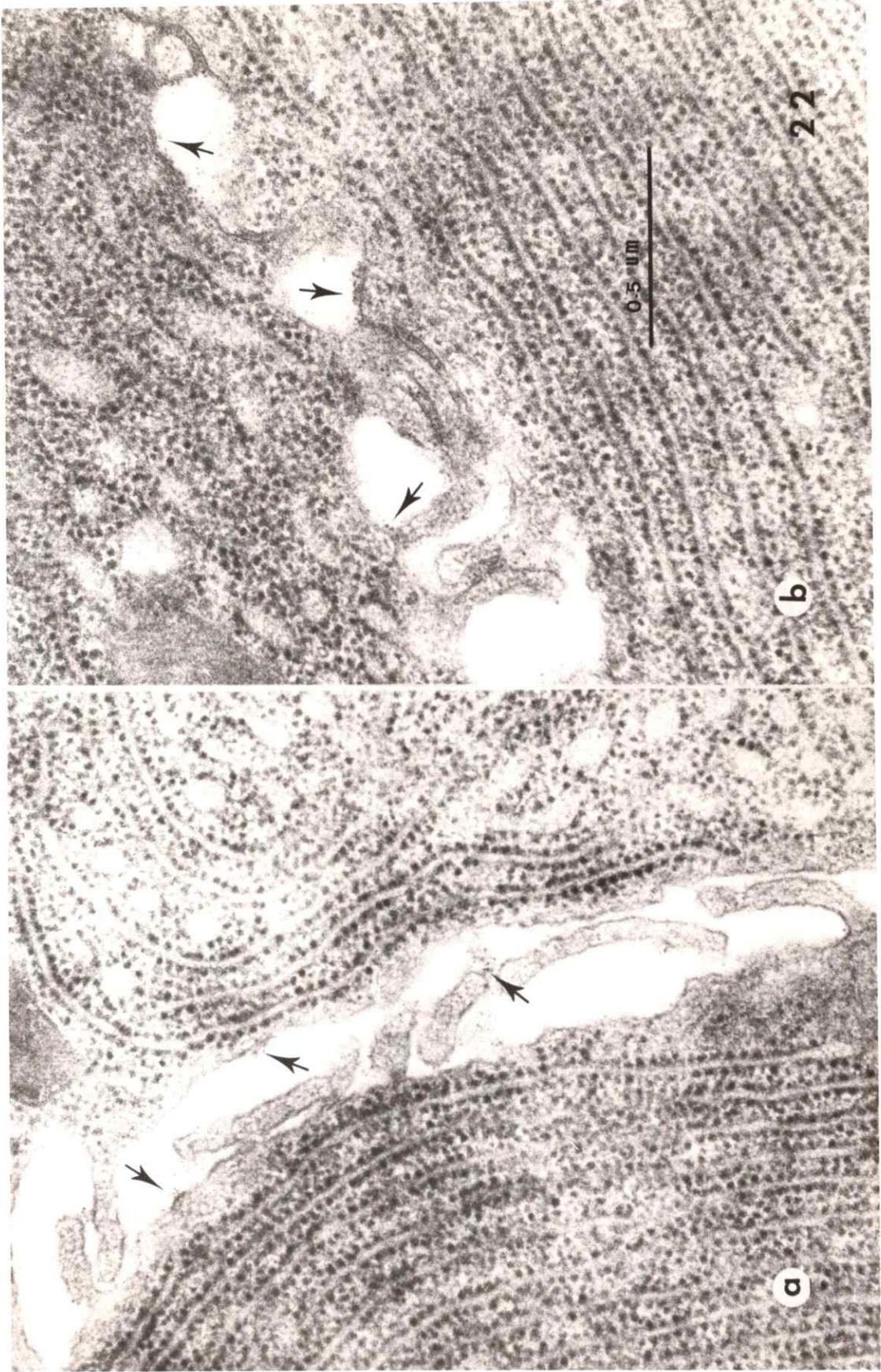
Acinos proveniente de parótidas no estimuladas ó estimuladas *in vivo* con IPR 0.45  $\mu$ moles/g de p.c. ó 1,5 nmoles/g de p.c. ó PIL 0.27  $\mu$ moles/g de p.c., se incubaron con Con-A/Fer ó WGA/Fer.

a) La superficie lateral de células acinares no estimuladas, presentan escasas partículas de ferritina ( $\uparrow$ ) distribuidas en forma discontinua.

Imagen idéntica para ConA-Fer como para WGA-Fer.

b) La superficie lateral de células acinares estimuladas con cualquiera de los agonistas antes citados, no presenta cambios a lo descrito en a).

Ambas microfotografías tienen el mismo aumento.



22

0.5 μm

b

a

## IV. DISCUSION

Para medir la respuesta secretora de los acinos, se ha utilizado la inspección morfológica de los gránulos de secreción y la determinación del contenido de  $\alpha$ -amilasa remanente en el citoplasma de las células acinares después de ser estimuladas. Estos parámetros han sido frecuentemente utilizados por otros autores para determinar secreción (Amsterdam y col., 1969; Simson, 1969; Schramm y col., 1976; Alliende y col., 1977 y 1978; Sans y Galanti, 1979; Santos, 1979; Barka y col., 1975; Mangos y col., 1975b y c).

Para cumplir con los objetivos enumerados en esta tesis, interesó obtener una preparación de acinos de parótida de ratones no estimulados o tratados con agonistas, para investigar la presencia y distribución de residuos de monosacáridos en la superficie basal, por incubación *in vitro* con lectinas específicas. Al mismo tiempo, esta preparación permite la estimulación *in vitro* con agonistas y el análisis del efecto directo sobre las células de las drogas utilizadas.

Ensayos anteriores realizados por Barka y col. (1975) mostraron que células acinares disociados de parótida de rata no respondían a los secretagogos empleados. Sin embargo, Mangos y col. (1975a), obtuvieron una preparación de células acinares de parótida de rata que respondieron a agonistas

adrenérgicos y colinérgicos. En estos trabajos, sólo se analizó la respuesta secretora inmediata.

En el presente trabajo interesó desarrollar un sistema celular *in vitro* cuya capacidad de respuesta reversible a la acción de agonistas se aproximara al máximo a la condición imperante en el organismo completo. Para este efecto se concluyó que era más adecuado trabajar con una preparación de acinos aislados de la parótida. En efecto, en esta situación las células no están sometidas a los tratamientos drásticos necesarios para su separación total. Por otra parte, ellas se encuentran parcialmente en el microambiente original. Estas condiciones aseguran una mejor preservación de su estructura y funciones en cultivos primarios.

Además, la configuración en acinos permite exponer plenamente la superficie basal al ataque de reactivos que puedan detectar grupos químicos específicos. Por último, siendo uno de los objetivos de esta tesis la identificación y distribución de residuos de monosacáridos en la superficie basal, la organización en acinos disminuye la posibilidad de reorganización o reordenamiento de receptores. Así, el estudio de polisacáridos en células disociadas de parótida (Amakawa y Barka, 1975) y de epitelio vesical (Pisam y Ripoché, 1976), muestra que en estas condiciones ocurre desplazamiento del producto de reacción desde la superficie apical a la basolateral.

Estos motivos llevaron a desarrollar la técnica de preparación de acinos, que se presenta en esta tesis.

Los resultados obtenidos al incubar acinos aislados con los agonistas empleados, demuestran que la preparación no solo responde rápidamente a los estímulos sino que además, colocada en medios adecuados, es capaz de recuperarse incluso de una exocitosis masiva. Estos resultados demuestran, por una parte, conservación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y colinérgicos y por otra, la capacidad de la célula de mantener, al menos por 24 hr, su actividad metabólica intacta.

La respuesta de los acinos aislados a diferentes concentraciones de isoproterenol corresponden estrechamente con lo observado cuando las parótidas se estimulan *in vivo*. Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando se incuban los acinos con pilocarpina. Así, la secreción de  $\alpha$ -amilasa es del orden del 70% cuando la parótida se estimula *in vivo* con esta agonista y sólo de un 30% cuando se induce secreción de los acinos *in vitro*.

Al respecto se ha visto que en parótida de rata la pilocarpina, además de sus propiedades parasimpático-miméticas, actuaría sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos a través del ganglio cervical superior. En efecto, la inyección de pilocarpina en ratas cuyos ganglios cervicales superiores han sido cortados, no provoca secreción de  $\alpha$ -amilasa aunque se induce el flujo de cationes típico del efecto colinérgico

(Schneyer, 1965 y 1969). Estos resultados han sido confirmados por Petersen y col. (1977). Sin embargo, los receptores colinérgicos no parecen depender del sistema simpático. Así, ratas recién nacidas fueron sometidas a simpatectomía y se midió el número de receptores colinérgicos y adrenérgicos en la parótida, en función de la edad de los animales. Se observó que los receptores colinérgicos aumentaron en igual número a los controles mientras que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos solo aumentaron lentamente después de un período de latencia. Estos hechos indicarían que tanto la presencia como el incremento en el número de receptores colinérgicos en la parótida de rata no dependería del sistema simpático. Por el contrario, este sistema modularía la presencia y el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Ludford y Talamo, 1980).

Los resultados presentados en esta tesis y la evidencia suministrada por la literatura no aclaran el mecanismo por el cual pilocarpina induce secreción de  $\alpha$ -amilasa en glándula parótida.

La recuperación de los niveles de  $\alpha$ -amilasa en los acinos estimulados con agonistas varía de acuerdo a la droga y a la concentración empleada. En general, una secreción masiva implica una recuperación más lenta. Sin embargo, no sólo la descarga masiva de gránulos de secreción sería la causa del retardo en la recuperación de los niveles de  $\alpha$ -amilasa. Así, parece existir una relación directa entre la

concentración de isoproterenol empleado, el efecto que se observa en el RER y la inhibición de síntesis de proteínas con la recuperación de las proteínas secretoras. A este respecto, una concentración de IPR de  $10^{-5}$  M ó mayor, produce una drástica dilatación de las cisternas del RER y un gran aumento del número de ribosomas libres, tanto en la zona apical como basal de las células acinares. Resultados similares se han obtenido *in vivo* con dosis altas de isoproterenol. La desorganización del RER coincide con la inhibición de la síntesis de proteínas (Alliende y col., 1979; Santos y Galanti, 1979; Durham y López-Solís, 1982). Por el contrario, dosis bajas de isoproterenol que sólo producen secreción, o pilocarpina, no alteran drásticamente la morfología del RER y no inhiben la síntesis de proteínas. Por lo tanto, la latencia en la recuperación de  $\alpha$ -amilasa observada con dosis altas *in vivo*, o concentraciones de  $10^{-5}$  M ó mayores *in vitro*, se deben muy probablemente a inhibición transitoria de la síntesis de proteínas por desorganización del RER, más que a exocitosis masiva. Esto es aún más evidente cuando se considera que la  $\alpha$ -amilasa es una proteína que se sintetiza en el RER (Castle y col., 1972; Tanaka y col., 1981).

Es interesante que las dosis de IPR que *in vivo* producen secreción masiva de gránulos de secreción, dilatación de las cisternas del RER, aumento en los ribosomas libres e inhibición transitoria de la síntesis de proteínas, induce

además síntesis de ADN y mitosis. *In vitro*, concentraciones de IPR mayores a  $10^{-5}$  M producen resultados similares.

En cuanto al aumento en el número de ribosomas libres Takahama y Barka (1965), demostraron que no hay aumento en la síntesis de ARN en parótida de rata estimulada a secretar y proliferar. Por lo tanto, el aumento de ribosomas libres descrito en esta tesis se puede deber principalmente a liberación de ribosomas originalmente asociados a membranas.

Otro hecho que indica la buena preservación de los acinos aislados mantenidos en medio enriquecido, es la alta sensibilidad que muestran frente a concentraciones de isoproterenol tan bajas como  $10^{-8}$  M, con una respuesta secretora similar a la obtenida con una concentración  $10^{-6}$  M. Además, la respuesta secretora aumenta con el incremento de la concentración de este agonista hasta una concentración de  $10^{-5}$  M, con la que se produce una descarga masiva de gránulos de secreción. Esta respuesta sugiere fuertemente que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se encuentran intactos.

El hecho que los acinos incubados por períodos prolongados presentan menor respuesta secretora, no puede explicarse por efecto de desensibilización. Este efecto se observa después de exposiciones prolongadas de tejidos a hormonas o neurotransmisores, que producen atenuación de la respuesta celular a nuevas estimulaciones con estos agentes (Stadel y col., 1983). Es más probable que la disminución observada en la

respuesta de los acinos a los agonistas sea debida a la incubación prolongada.

La glándula parótida de ratón ha sido ampliamente utilizada en estudios de secreción, proliferación e hipertrofia celular. Para ellos, se ha empleado agonistas adrenérgicos y colinérgicos. El isoproterenol es un agonista  $\beta$ -adrenérgico que en dosis bajas provoca solo exocitosis de gránulos de secreción y en dosis altas además estimula la síntesis de ADN y mitosis (Sans y Galanti, 1979). Pilocarpina, agonista colinérgico, provoca solo secreción (Santos, 1979).

Empleando este sistema, se ha estudiado los niveles de carbohidratos neutros, aminados y ácidos en fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas de parótida de ratón (López y Galanti, 1976; Rivera y Galanti, 1982). Cuando las células acinares se estimularon a secretar y a proliferar, se observó una disminución en el contenido de carbohidratos neutros de la fracción de membranas. Por el contrario, estímulos que inducen sólo secreción provocan un ligero aumento en el contenido de ácido siálico en la membrana, mientras que la inducción de secreción y proliferación causa una disminución drástica en el contenido de este residuo en la fracción de membranas.

Por otra parte, Santos (1979), ha estudiado la expresión de los antígenos de histocompatibilidad en las mismas preparaciones enriquecidas de membranas plasmáticas de

parótida de ratón. Este autor observó que estímulos que inducen sólo secreción provocan aumento en la expresión de estos antígenos, mientras que un estímulo que induce secreción masiva y proliferación celular, reduce a tiempos cortos, la expresión de estos antígenos en la superficie. Es interesante mencionar que los antígenos de histocompatibilidad presentan una cantidad importante de ácido siálico (Parham y col., 1974).

Estudios citoquímicos dirigidos a detectar polisacáridos en la superficie de células acinares de parótida de ratón, mostraron sólo pequeñas variaciones en la reactividad de la superficie apical cuando se induce secreción parcial y pérdida de reactividad en condiciones de secreción masiva y proliferación celular (Alliende y col., 1978). Estos cambios, al igual que los encontrados para la expresión de antígenos H-2, se postulan asociados al proceso de exocitosis.

Los resultados antes citados no informan sobre la variedad y distribución de los carbohidratos estudiados, como tampoco sobre su localización en las diferentes regiones de la membrana de las células acinares. Sin embargo, queda claro que la acción de agonistas determina cambios cualitativos y cuantitativos substanciales en la membrana de estas células. Este hecho, sumado a observaciones que indican participación de ácido siálico y galactosa en la respuesta celular a insulina (Cuatrecasas e Illiano, 1971; Rosenthal y Fain, 1971), ó

de residuos de fucosa en la adquisición de la respuesta secretora a agonistas en células acinares de páncreas (Jamieson, 1979), llevaron al análisis más detallado de la participación de residuos de carbohidratos en la membrana plasmática de células acinares de parótida de ratón frente a agonistas.

Las terminaciones nerviosas adrenérgicas y colinérgicas llegan directamente a la membrana basal de las células acinares. La relación entre estas terminaciones nerviosas y los receptores de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos ó colinérgicos de la superficie basal ocurre a través de los neurotransmisores químicos correspondientes. Por lo tanto, para investigar el efecto de los agonistas empleados en esta tesis sobre la superficie de las células acinares, se seleccionó la zona basal.

De los resultados presentados en esta tesis se concluye, que existen residuos de manosa y de ácido siálico terminales que están distribuidos de diferente manera en la superficie basal de células acinares. Así, los residuos de manosa muestran una distribución continua a lo largo de la superficie basal, mientras que el ácido siálico se presenta en parches. Esta distribución permanece constante entre 4°C y 37°C.

En general, es sabido que los residuos de carbohidratos que se reconocen con lectinas presentan una distribución

en la superficie celular que depende de la temperatura de incubación. Así, los receptores a lectinas se distribuyen en forma continua a temperaturas de 0°C a 4°C, mientras que se organizan en parches o incluso, se agregan en una zona de la superficie, a 37°C (Karsenti y Avrameas, 1973; Nicolson, 1974; Feigenson y col., 1976; Barazzone y col., 1980). Sin embargo, en células de hígado en cultivo y en reposo, se ha observado que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se encuentran distribuidos en parches en un rango de temperatura entre 4°C y 37°C (Henis y col., 1982). Estos receptores sólo se distribuyen en forma continua cuando las células se estimulan con isoproterenol. Si bien no existe información sobre la presencia de ácido siálico en los polipéptidos que conforman los receptores  $\beta$  (Schorr y col., 1982; Cerione y col., 1983), existe siempre la posibilidad que ellos se encuentren asociados a moléculas ricas en este carbohidrato. Esta situación explicaría la similitud de comportamiento a la temperatura de los residuos de ácido siálico en células acinares de parótida y de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en células hepáticas en cultivo.

En poco probable que las moléculas de membrana que contienen ácido siálico se encuentren dispersas a lo largo de la membrana y sólo formen agregados cuando interaccionan con WGA. En este caso, la formación de agregados sería dependiente de la temperatura e independiente del agonista

empleado.

Es más probable que las moléculas portadoras de ácido siálico se encuentren formando agregados, entre ellas ó con otras moléculas como receptores  $\beta$ -adrenérgicos por ejemplo, antes de su interacción con la lectina. Es también posible que estas moléculas que contienen ácido siálico sean proteínas integrales de la membrana plasmática que podrían a su vez estar asociadas a elementos del citoesqueleto. Al respecto, se ha demostrado que la fracción cuantitativamente más importante de ácido siálico, en una preparación enriquecida en membrana plasmática de parótida de ratón, se encuentra asociada a moléculas de muy baja polaridad (López y Galanti, 1976; Rivera y Galanti, 1982).

Como se ha indicado anteriormente, es poco probable que la distribución en parches de receptores a WGA se deba a internalización del complejo lectina-molécula portadora de ácido siálico. Así, en ningún caso se ha encontrado vesículas endocíticas conteniendo WGA-Fer.

En cuanto a la distribución continua de los residuos de manosa, podría deberse a que estos receptores se encuentran separados en el plano de la membrana por distancias superiores a las requeridas por ConA para formar agregados. Se ha descrito que se necesita de una distancia mínima de aproximadamente 10 nm entre receptores de ConA para que esta lectina sea capaz de inducir agregación (Garrido y col., 1974). El depósito de

la lectina en varios planos a partir de la membrana plasmática puede indicar la proyección de oligosacáridos, probablemente ramificados, hacia el medio extracelular.

La pérdida de reactividad a ConA observada después de aplicar estímulos que inducen sólo secreción, podría indicar pérdida de residuos de manosa o enmascaramiento de los receptores que llevan este monosacárido. En fracciones enriquecidas en membrana plasmática de parótida de ratón estimulados con agonistas que inducen sólo secreción, se ha demostrado pérdida importante de carbohidratos neutros (López y Galanti, 1976). Por otra parte, la estimulación *in vitro* de acinos aislados de parótida con IPR  $10^{-6}$  M, que induce una secreción importante, elimina la reactividad de la superficie basal a ConA. Por el contrario, la incubación de estos mismos acinos con PIL  $10^{-3}$  M, que provoca una secreción de aproximadamente 30%, no modifica la reactividad ni la distribución de los residuos de manosa a ConA. Estos hechos sugieren fuertemente que IPR y no así pilocarpina induce directamente pérdida de residuos de manosa de la superficie basal. Sin embargo, esta última droga elimina la reactividad a ConA cuando los acinos se estimulan *in vivo*, lo que apunta nuevamente a que pilocarpina actúa en estas condiciones, a través del sistema simpático.

La reactividad aparente a WGA de la superficie basal de las células acinares tanto *in vivo* como *in vitro* aumenta

---

cuando éstas se estimulan solo a secretar con IPR. Los experimentos realizados con lectina radioactiva, y la determinación de ácido siálico liberado por neuraminidasa de acinos aislados después de la estimulación a secretar, confirman que existe un aumento real de ácido siálico en la superficie celular en estas condiciones. Considerando que el proceso de secreción inducido por isoproterenol implica muy probablemente eliminación de residuos de manosa de la superficie celular, cabe la posibilidad que de esta manera se expongan nuevos residuos de ácido siálico o que los mismos residuos adquieran mayor reactividad. Sin embargo, el aumento en el contenido de ácido siálico en membranas plasmáticas obtenidas de parótidas después de estimulación a secreción parecería indicar que lo que en realidad ocurre es un incremento de ácido siálico en la superficie celular. Este aumento podría explicarse como resultado de la incorporación de nueva membrana, rica en ácido siálico, proveniente de microvesículas que se fusionan con la membrana plasmática.

El reordenamiento de los receptores de lectina, de una distribución en parches a otra continua por estimulación del proceso secretor puede explicarse por cambios en la movilidad de las moléculas portadoras de ácido siálico en el plano de la membrana, como consecuencia de la eliminación de los residuos de manosa. También es posible que una modificación de las fuerzas que hacen posible la interacción entre las moléculas que se unen a WGA sean responsable del

referido reordenamiento. Nuevamente esta redistribución de receptores se observó con isoproterenol cuando el experimento se realizó *in vitro*; pillicarpina, en estas condiciones no modificó la distribución en parches de los residuos de ácido siálico.

La dosis alta de isoproterenol administrado *in vivo*, provoca secreción masiva de  $\alpha$ -amilasa e induce síntesis de ADN y mitosis (Sans y Galanti, 1975-79). En estas condiciones los receptores de ConA se encuentran en íntima relación con la membrana plasmática, a diferencia de la distribución en varios planos que presentan las células no estimuladas. Empleando estas mismas condiciones, López y Galanti (1976), demostraron que a tiempos cortos después de la estimulación con isoproterenol ocurre una disminución en el contenido de carbohidratos neutros y de ácido siálico en fracciones enriquecidas en membrana plasmática. Por lo tanto, la imagen de partículas de ferritina sólo en un plano después de estimular secreción masiva podría indicar eliminación de manosa de la superficie. Sin embargo, es interesante que una dosis baja de isoproterenol, que induce sólo secreción, provoca pérdida total de reactividad a ConA en la superficie basal mientras que una dosis alta, que induce secreción masiva y proliferación, mantiene una reactividad clara aunque sólo en un plano. Una explicación a este resultado se encuentra en el hecho que, además de la salida de residuos de manosa expuestos

en la superficie, la dosis alta de isoprotenerol provoca pérdida de residuos de ácido siálico terminal. Este proceso, ampliamente demostrado en esta tesis y en trabajos anteriores, expondría residuos de manosa subterminales que necesariamente deberían encontrarse más cercanos al plano de la membrana. Esta proposición no sólo explica la reactividad a ConA en la superficie celular después de un estímulo que produce una secreción vigorosa sino además la distribución observada de los receptores. Los experimentos realizados para ensayar esta hipótesis parecen confirmarlo. Así, el tratamiento de los acinos aislados con neuraminidasa y su posterior incubación con ConA, resulta en una imagen de reactividad de la superficie basal similar a la observada después de la estimulación de los acinos *in vivo* con la dosis alta de isoproterenol.

Además, manosidasa elimina la reactividad de la superficie basal a ConA en acinos provenientes de parótidas estimuladas con la dosis alta de isoproterenol. Este resultado nuevamente sugiere que la eliminación de ácido siálico de la superficie basal producido por la dosis alta de isoproterenol expone nuevos residuos de manosa.

Por otra parte, la dosis alta de isoproterenol provocó una disminución aparente de la reactividad a WGA de la superficie basal. Los experimentos realizados con WGA-<sup>3</sup>H demostraron una caída vertical de la unión de la lectina a los

acinos aislados. Más aún, la cantidad de ácido siálico liberado por neuraminidasa de acinos aislados de parótidas estimuladas con la dosis alta de isoproterenol fue significativamente menor que la liberada de acinos no estimulados. Estos resultados, sumados a la pérdida en el contenido de ácido siálico de fracciones enriquecidas de membrana plasmática obtenidas de parótidas estimuladas con la dosis alta de isoproterenol, indican que la disminución aparente de reactividad a WGA observada en la superficie basal corresponde a pérdida de ácido siálico de este compartimento de la membrana.

El hecho que isoproterenol  $10^{-5}$  M provoca una disminución de la reactividad de la superficie basal a WGA cuando se incuba *in vitro* con acinos aislados, indica que la acción de la droga es directa, como ya se había indicado para residuos de manosa.

Hay evidencias que sugieren que el isoproterenol activa glicosidasas de la superficie celular. Así, en los experimentos en los que se incubó acinos aislados con neuraminidasa, se observó una actividad endógena de esta enzima. Por otra parte, López y Galanti (1976), encontraron que la incubación de una fracción enriquecida en membrana plasmática de parótida de ratón con isoproterenol provoca una pérdida significativa de ácido siálico. Basados en estos resultados estos autores postularon que el isoproterenol activaba una neuraminidasa presente en la membrana plasmática. Existen

referencias en la literatura sobre la presencia de neuraminidasa en la superficie celular de plaquetas (Bosmann, 1979), eritrocitos (Bosmann, 1974) y células hepáticas (Pricer y Ashwell, 1971). Por otra parte, la recuperación de la reactividad de la superficie basal a WGA, después de la dosis alta de isoproterenol, concuerda con la recuperación de los niveles de ácido siálico en membranas aisladas de parótida estimulada con la misma dosis del agonista (López y Galanti, 1976; López y Durham, 1983). Estos últimos autores han demostrado, además, la presencia de una sialil-transferasa en la membrana plasmática de parótida de ratón, cuya actividad aumenta simultáneamente con la recuperación de los niveles de ácido siálico en la membrana, después de la estimulación con la dosis alta de isoproterenol.

Otro hecho interesante es que el ácido siálico se pierde de la membrana plasmática sólo en respuesta a dosis de isoproterenol que inducen secreción masiva, síntesis de ADN y mitosis. Este hecho ha sido confirmado en otros sistemas experimentales. Así, células de músculo liso y fibroblastos mantenidos en cultivo en reposo proliferativo son estimulados a proliferar cuando se tratan con neuraminidasa (Nilsson y col, 1982; Vaheri y col., 1972). Por otra parte, Enrich y col. (1983), demostraron que ocurría pérdida de ácido siálico de una fracción de membrana plasmática preparada

de hígado de ratones sometidos a hepatectomía parcial. La salida de ácido siálico de la membrana aparecía como un suceso temprano en el período prereplicativo.

La salida de ácido siálico de la membrana plasmática debe producir un fuerte reordenamiento de las moléculas que conforman la membrana. Así, en preparaciones de membranas de parótida de ratón se ha demostrado que la remoción de ácido siálico produce cambios en la actividad de algunas enzimas de membrana. Se ha postulado que estos cambios reflejan variaciones en las interacciones que existen entre las moléculas integrales de membrana (López y Durham, 1983). Esta hipótesis parece confirmada con las variaciones medidas por dicroísmo circular, producida en una fracción de membrana plasmática aislada de hepatocitos y tratada con neuraminidasa (Reutter y col., 1978). Este autor confiere al ácido siálico un efecto estabilizante sobre la conformación de gliconjugados de la membrana, independiente de la conferida por las asociaciones de las moléculas de membrana con microfilamentos y microtúbulos.

La estimulación de la síntesis de ADN inducida por isoproterenol en parótida de ratón, ocurre sin la participación directa de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y por un mecanismo que no involucra al AMP cíclico (Durham y col., 1974b). Por lo tanto, el ácido siálico parece jugar un rol protagonista en la transición reposo proliferativo - proliferación

celular, posiblemente a través de su interacción con el ión Ca (Durham, observaciones no publicadas).

Considerando que la presencia y patrón de distribución de residuos de azúcares, que confieren especificidad a la superficie celular, están controlados genéticamente (Kalkar, 1965), es posible postular que la distribución de residuos terminales de ácido siálico y manosa presentarían un ordenamiento particular en la superficie de la célula. Finalmente, perturbaciones que afecten la cantidad y distribución de estos residuos podrían alterar los mecanismos que regulan la inducción de secreción y de proliferación celular.

## V. CONCLUSIONES

1. Los acinos después de la disgregación mantienen su integridad morfológica y metabólica.
2. La superficie basal de las células acinares presenta residuos de manosa y ácido siálico terminales como componentes de glicoconjugados de la membrana plasmática basal.
3. La inducción de secreción en el animal completo o *in vitro* con isoproterenol provoca pérdida de residuos de manosa desde el glicocaliz de la superficie basal.
4. Pilocarpina induce pérdida de residuos de manosa sólo en la superficie basal de células acinares estimuladas a secretar en el animal completo. Este hecho, sumado a otros descritos en la literatura, sugiere fuertemente que pilocarpina induce secreción de  $\alpha$ -amilasa actuando por vía adrenérgica.
5. La inducción de secreción y la estimulación de la síntesis de ADN, en el animal completo o *in vitro*, con isoproterenol provoca disminución del contenido de residuos de ácido siálico en la superficie basal de las células acinares. La pérdida de ácido siálico expone residuos de manosa subterminales.
6. Glicoconjugados que portan residuos de manosa, no modifican su distribución en la superficie basal de las células acinares, después de ser estimuladas a secretar y/o proliferar. Glicoconjugados que contienen residuos de

ácido siálico presentan dos tipos de ordenamiento, discontinuo o en parche y continuo. Se suministra evidencia que demuestra que la estimulación a secretar ó a proliferar puede gatillar tal transición.

## VI. BIBLIOGRAFIA

Alliende, C., Leiva, S. and Galanti, N. 1976. "Cytochemistry on the cell surface of the acinar cells from mouse parotid glands after stimulation to secretion and DNA synthesis". *Rev. Micr. Electr.* 3: 4. (A)

Alliende, C., Leiva, S. y Galanti, N. 1977. "Ultraestructura de células acinares de parótida de ratón. Efecto de Isorpoterol. *Arch. Biol. Med. Exp.* 10: R-118.

Alliende, C., Leiva, S. and Galanti, N. 1978. "Cytochemical detection of polysaccharides on mouse parotid acinar cells". *Histochemistry* 55: 139 - 146.

Alliende, C., González, M.J. y López-Solís, R.O. 1979. "Síntesis protéica y ultraestructura del R.E.R. en glándulas parótidas de ratón". *Arch. Biol. Med. Exp.* 12: 494. (A).

Amakawa, T. and Barka, T. 1975. "Distribution of Con-A binding sites on the surface of dissociated rat submandibular gland acinar cells. *The J. of Histochem and Cytochem.* 23: 607 - 617.

- Amsterdam, A., Ohad, I. and Schramm, M. 1969. "Dynamic changes in the ultrastructure of the acinar cell of the rat parotid gland during the secretory cycle. J. Cell Biol. 41: 753 - 773.
- Au, D., Malbon, G. and Butcher, F. 1977. "Identification and characterization of  $\beta_1$ -adrenergic receptors in rat parotid membranes". Biochimica et Biophysica Acta 500: 361 - 371.
- Barazzone, Ph., Carpentier, J.L., Gorden, Ph., Van Obberghen, E., and Orci, L. 1980. "Polar redistribution of  $^{125}$ I - labelled insulin on the plasma membrane of cultured human lymphocytes". Nature 286: 401 - 403.
- Barka, T. and Van der Noen, H. 1975. "Dissociation of rat parotid gland". Laboratory Investigation 32: 373 - 381.
- Baserga, R. 1984. "Growth in size and cell DNA replication". Exptl. Cell Res. 151: 1 - 5.
- Bernfeld, P. 1955.  $\alpha$ -Amylase. In: Methods in Enzymology. S.P. Colowick and N.O. Kaplan eds. Acad. Press. Inc. N.Y., 1: 149 - 158.

- Bernhard, W. and Avrameas, S. 1971. "Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of Concanavalin A". *Exptl. Cell Res.* 64: 232 - 236.
- Bosmann, H.B. 1972. "Platelet adhesiveness and aggregation. II. Surface sialic acid, glycoprotein: N-acetylneuraminic acid transferase and neuramidase of human blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 279: 456 - 474.
- Bosmann, H.G. 1982. "Sialic acids chemistry, metabolism and function". ed. R. Schauer, Springer-Verlag, Wien New York, 10: 263 - 305.
- Burton, K. 1956. "A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid". *Biochem. J.* 62: 315 - 323.
- Byrt, P. 1966. "Secretion and synthesis of amylase in the rat parotid gland after isoprenaline. *Nature* 212: 1212-1215.
- Carpentier, J.L., Gorden, Ph., Barazzone, Ph., Freychet, P., Le Cam, A. and Orci, L. 1979. "Intracellular localization of <sup>125</sup>I-labeled insulin in hepatocytes from intact liver". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 2803-2807.

Castle, D., Jamieson, J.D. and Palade, G. 1972. "Radioautographic analysis of the secretory process in the parotid acinar cell of the rabbit". *The J. of Cell Biology* 53: 290 - 311.

Cerione, R., Strulorroi, B., Berzovic, J., Lefkowitz, P. and Caron, M. 1983. "Pure  $\beta$ -adrenergic receptor: the single polipeptide confers catecholamine responsiveness to adenylate cyclase". *Nature* 306: 566.

Corfield, A. and Schauer, R. 1979. "Current aspects of glycoconjugate biosynthesis". *Biol. Cellulaire* 36: 213 - 226.

Cuatrecasas, P. and Illiano, G. 1971. "Membrane sialic acid and the mechanism of insulin action in adipose line cells". *The J. of Biological Chemistry* 246: 4938 - 4946.

Chandra, S. and Skelton, F. 1964. "Staining of yuxta-glomerular cells with toluidine blue or basic fuchsin for light microscopy after epon embeddment. *Stain Technol.* 39: 107.

De Camilli, P., Peluchetti, D. and Meldolesi, D.J. 1974. "Structural difference between luminal, lateral plasmalemma in pancreatic acinar cells". *Nature* 248: 245.

De Camilli, P., Peluchetti, D. and Meldolesi, D.J. 1976. "Dynamic changes of the luminal plasmalemma in the estimated parotid acinar cells". *J. Cell Biol.* 70: 52-74.

Durham, J. and Galanti, N. 1974a. "The effect of isoproterenol upon the activity and intracellular distribution of pyrimidine nucleoside kinases in the mouse parotid gland. *J. Biol. Chem.* 249: 1806 - 1813.

Durham, J., Baserga, K. and Butcher, F. 1974b. "The effect of isoproterenol and its analogs upon adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate levels in mouse parotid gland *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 372: 196-217.

Durham, J. and López-Solís, R-O. 1982. "The effect of isoproterenol and cycloheximide on protein synthesis and growth in mouse parotid". *Experimental and Molecular Pathology* 37: 235 - 248.

Edelman, G. 1976. "Surface modulation in cell recognition and cell growth". *Science* 192: 218 - 226.

Edelman, G. 1977. Transmembrane control and surface modulation in animal cells". In: *Cell Shape and Surface Architecture*, 467-480, ed. J. Paul Revel y col., New York.

Enrich, C., Bachs, E., Rius, J., Serratosa, J. and Domingo, J. "Quantitative and qualitative changes of plasma membrane glycoproteins in the early period of liver regeneration. In press *Biochim. and Biophys. Acta*.

Evans, H. 1980. "A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte". *Biochimica et Biophysica Acta* 604: 27 - 64.

Feigenson, M., Baggiolini, M. and Schnebli, H. 1976.

"Capping of Con-A or Ricin-binding sites does not influence phagocytosis in polymorphonuclear leukocytes. *Experientia* 32: 1264 - 1266.

Galanti, N. 1978. "Receptores de membrana". *Arch. Biol. Med. Exp.* 11: R-53.

Garrido, J., Burglen, M-J., Samolyk, D., Wicker, R. and Bernhard, W. 1974. "Ultrastructural comparison between the distribution of Concanavalin A and wheat germ agglutinin cell surface receptors of normal and transformed hamster and rat cell lines". *Cancer Res.* 34: 230 - 243.

Giblett, E. 1969. "Genetic markers in human blood". ed. by Spottiswoode, Ballantyne and Co. Ltd. London and Colchester, Chapter 9: 268 - 325.

Glick, M.-C., Comstock, C., Cohen, M. and Warren, L. 1971. "Distribution of sialic acid, hexosamines and sialidase in the L cells". *Biochimica et Biophysica Acta* 233: 247 - 257.

Henis, J., Hekman, M., Elson, E. and Helmreich, E. 1982. "Lateral motion of  $\beta$ -receptors in membranes of cultured liver cells". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 2907 - 2911.

Houslay, M. 1984. "A better view of  $\beta$ -receptors". Trends in Biochemical Sciences 9: 208 - 209.

Hopkins, C. 1979. The secretory process in outline. Symposium XXXIII. "Secretory mechanisms", ed. by Society Experimental Biology, Cambridge University Press, p. 1-8.

Hughes, C. and Sharon, N. 1978. "Carbohydrates recognized". Nature 274: 637 - 638.

Hubbard, S. and Robbins, P. 1979. "Synthesis and processing of protein-linked oligosaccharides *in vivo*". J. Biol. Chem. 254: 4568 - 4576.

Jamieson, J.D., Hull, B.E., Galardy, R.E. and Maylié-Pfleninger, M.-F. 1979. "Surface properties of pancreatic acinar cells: relationship to secretagogue action". Symposia Ed. by Society for Experimental Biology. Symposium XXXIII. Secretory Mechanisms, Cambridge University, pag. 145-160.

Jancik, J. and Schuer, R. 1983. "Sialic acid- a determinant of the life-time of rabbit erythrocytes". Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355: 395 - 400.

Kalckar, H.M. 1965. "Galactose metabolism and cell sociology". Science 150: 305 - 313.

Karsenti, E. and Avrameas, S. 1973. "The use of Concanavalin A in the study of the dynamics of lymphocyte membrane glycans". FEBS Letters 30: 238 - 242.

Kirby, W. and Parr, E. 1979. "The occurrence and distribution of H-2 antigens on mouse intestinal epithelial cells". The J. of Histochem. and Cytochem. 27: 746 - 750.

Kraus, F.W. and Mestecky. 1971. "Inmunohistochemical localization of amylase, lysozyme and immunoglobulins in the human parotid gland ". Arch. Oral Biol. 16: 781 - 789.

Kurtz, S. 1964. "The salivary glands. Electron microscopic anatomy". ed. by Stanley Kurtz, New York and London, pág. 97-122.

López-Solís, R.O. 1976. "Cambios en la membrana plasmática relacionados con la inducción de la síntesis de DNA y mitosis en eucariontes. Tesis para optar al grado de Licenciado en Bioquímica, Universidad de Chile.

- López, R. and Galanti, N. 1976. "The effect of isoproterenol upon the chemical composition of plasma membranes in the mouse parotid gland". *Differentiation* 5: 155 - 160.
- López-Solís, R.O. and Durham, J. 1983. "Purification of plasma membranes from mouse parotid gland and membrane reorganization in response to isoproterenol". *Biochim. et Biophys. Acta* 729: 237 - 248.
- Ludford, J. and Talamo, B. 1980. " $\beta$ -adrenergic and muscarinic receptors in developing rat parotid glands, selective effect of neonatal sympathetic denervation". *J. of Biological Chemistry* 255: 4619 - 4627.
- Mangos, J., Mc Sherry, N., Butcher, F., Irwin, K. and Barber, T. 1975a. "Dispersed rat parotid acinar cells. I. Morphological and functional characterization". *American Journal of Physiology* 229: 553-559.
- Mangos, J., Mc Sherry, N., Barber, T., Arvanitakis, S. and Wagner, V. 1975b. "Dispersed rat parotid acinar cells. II. Characterization of adrenergic receptors". *American J. of Physiology* 229: 560 - 565.
- Mangos, J., Mc Sherry, N. and Barber, T. 1975c. "Dispersed rat parotid acinar cells. III. Characterization of cholinergic receptors". *American J. of Physiology* 229: 566 - 569.

- Martínez-Palomo, A., Erlij, D. and Bracho, H. 1971.  
"Localization of permeability barriers in the frog skin epithelium". J. Cell Biol. 50: 277 - 282.
- Maylié-Phenninger, M.-F. and Jamieson, J.D. 1979.  
"Distribution of cell surface saccharides on pancreatic cells II. The J. Cell Biol. 80: 77 - 95
- Maylié-Phenninger, M.-F. and Jamieson, J.D. 1980.  
"Development of cell surface saccharids on embryonic pancreatic cells". J. Cell Biol. 86: 96 - 103.
- Morré, D.J. and Ovtracht, L. 1977. "Dynamics of the Golgi apparatus: Membrane differentiation and membrane flow".  
In: Rev. Cyt. (Bourne, G.H., Danielli, J.F. and Jeon, K.W. eds.) N.Y. acad. Press, Suppl. 5: 61 - 188.
- Munger, B.L. 1958. "A phase and electron microscopy study of cellular differentiation in pancreatic acinar cells of the mouse". The Am. J. of Anat. 103: 1-34.

Nicolson, G.L. 1971. "Difference in the topology of normal and tumor cell membranes as shown by different distributions of ferritin-conjugated Concanavalin A on their surfaces". *Nature New Biol.* 233: 244 - 246.

Nicolson, G. 1974. "Factors influencing the dynamic display of lectin binding sites on normal and transformed cell surfaces". Reproduced from *Control of proliferation in Animal cells*, Cold Spring Harbor Laboratory, pag. 251-270.

Nilsson, J., Ksiazek, T. and Thyberg, J. 1982. "Effects of neuraminidase on DNA synthesis, proliferation and endocytosis of cultivated arterial smooth muscle cells". *Exp. Cell Res.* 142: 333 - 339.

Noonan, K., Levine, A. and Burger, M. 1973. "Cell cycle dependent changes in the surface membrane as detected with (<sup>3</sup>H) Concanavalin A". *The J. of Cell Biol.* 58: 491 - 497.

Palade, G. 1975. "Intracellular aspects of the process of protein secretion". *Science* 189: 347 - 358.

Parks, H.G. 1961. "On the fine structure of the parotid gland of mouse and rat. Am. J. Anat. 108: 303 - 329.

Parks, H.R. 1962. "Morphological study of the extension of secretory materials by the parotid glands of mouse and rat". J. Ultrastructural Res. 6: 449 - 465.

Parham, P., Humphreys, R., Turner, M. and Strominger, J. 1971. "Heterogeneity of HL-A antigen preparations is due to variable sialic acid content". Proc. Nat. Acad. Sci., USA 71: 3998 - 4001.

Petersen, O., Gray, A. and Hall, R. 1977. "The relationship between stimulation induced potassium release and amylase secretion in the mouse parotid". European J. of Physiology 369: 207 - 211.

Pisam, M. and Ripoche, P. 1976. "Redistribution of surface macromolecules in dissociated epithelial cells". The J. of Cell Biology 71: 907 - 920.

Pricer, W. Jr. and Ashwell, G. 1971. "The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver". The J. of Biol. Chem. 246: 4825 - 4833.

Rambourg, A. 1969. "Localisation ultrastructurale et nature du material coloré au niveau de la surface cellulaire par le mélange chromique-phosphotungstique". J. Microscopie 8: 325 - 342.

Reutter, W., Köttgen, E., Bauer, Ch. and Gerok, W. 1982. In: Sialic Acids Chemistry, Metabolism and Function. ed. by R. Schauer, Springer-Verlag wien New York. 10: 263 - 305.

Reynolds, E. 1963. "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy". J. Cell Biol. 17: 208 - 212.

Rivera, S. 1978. "Acido siálico y ácido ribonucléico en membranas plasmáticas. Relación con la proliferación celular". Tesis de Licenciatura en Bioquímica, Universidad de Chile.

Rivera, S. and Galanti, N. 1982. "Sialic acid in mouse parotid plasma membranes: Its relationship with secretion and cell proliferation". Cell Biology. International Reports, 6: 917 - 923.

Rodríguez-Boulan, E. and Sabatini, D. 1978. "Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: A model system for study of epithelial polarity". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 5071 - 5075.

Rosenthal, Y. and Fain, Y. 1971. "Insulin like effect of clostridial phospholipase C, neuraminidase and other bacterial factors on brown fat cells". J. Biol. Chem. 246: 5888 - 5895.

Roth, J., Brown, D. and Orci, L. 1983. "Regional distribution of N-acetyl-D-galactosamine residues in the glycocalyx of glomerular podocytes". The J. of Cell Biology 96: 1189 - 1196.

Sans, J. and Galanti, N. 1975. "Induction of DNA synthesis and mitosis by hemilateral parotidectomy". Proc. IInd Conference on Differentiation, Copenhage, p. 138.

Sans, J. and Galanti, N. 1979. "Effect of some drugs and unilateral parotidectomy upon secretion and cell proliferation in the mouse parotid gland". Cellular and Molecular Biology 25: 107 - 112.

Santos, M. y Galanti, N. 1978. "Distribución subcelular de amilasa y secreción en parótida de ratón". Arch. Biol. Med. Exp. 11: 243.

Santos, M. 1979. "Antígenos de histocompatibilidad H-2 en parótida de ratón. Factores que regulan su exposición". Tesis de Doctorado en Biología Celular. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Scott, B.K. and Pease, D. 1959. "Electron microscopy of the salivary and lacrimal glands of the rat". The Am. J. of Anat. 104: 115 - 140.

Schorr, R., Heald, S., Jeffs, P., Lavin, T., Strohsacker, M., Lefkowitz, R. and Caron, M. 1982. "The  $\beta$ -adrenergic receptor: Rapid purification and covalent labeling by photoaffinity crosslinking". Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79: 2778 - 2782.

Schneider, W.C. 1957. "Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis". Method in Enzymology. Acad. Press, N.Y. III : 680 - 683.

Schneyer, C. and Hall, N. 1965. "Comparison of rat salivary evoked by auriculo-temporal and pilocarpine stimulation". Am. J. Physiol. 209: 484 - 488.

Schneyer, C. 1969. " $\beta$ -adrenergic effects by autonomic agents on mitosis hypertrophy in rat parotid". Proc. Soc. Exptl. Biol. 131: 71 - 75.

Schramm, M. and Selinger, Zvf. 1974. "The function of  $\alpha$  and  $\beta$ -adrenergic receptors and a cholinergic receptor in the secretory cell of rat parotid gland". Advances in Cytopharmacology 2: 29 - 32.

Sharon, N. 1977. "Lectins". Scientific American 236: N°6  
108 - 119.

Simionescu, M., Simionescu, N. and Palade, G. 1983.  
"Differentiated microdomains on the luminal surface of capillary endothelium: Distribution of lectin receptors".  
The J. of Cell Biol. 94: 406 - 413.

Simson, J.V. 1968. "A study of effects of isoproterenol on the cytology of the parotid and submandibular glands of the rat". Tesis de Doctorado. Graduate School of the State University of the New York.

Simson, J.V. 1969. "Discharge and restitution of secretory material in the rat parotid gland in response to isoproterenol". Z. Zellforsch 10: 175 - 191.

Singer, S.J. and Nicolson, G.L. 1972. "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes". Science 175: 720-731.

Skutelsky, E. and Danon, D. 1970. "Comparative study of nuclear expulsion from the late erythroblast and cytokinesis". Exp. Cell Res. 60: 427 - 436.

Skutelsky, E., Marikovsky, Y and Danon, D. 1976. "Binding of peanut lectin to the surface of young, old, and neuraminidase-treated human red bloods cells". In: Electron Microscopy, ed. Ben Shaul. Tal International Publishing Co. Tel Aviv 2: 195 - 197.

Skutelsky, E. and Bayer, E. 1983. "Cell type related segregation of surface galactosyl containing components at and early developmental stage in homopoietic bone marrow cells in the rabbit". *The J. of Cell Biology* 96: 184-190.

Spearman, T. and Butcher, F. 1981. "Rat parotid gland protein kinase activation, relationship to enzyme secretion". *Molecular Pharmacology* 21: 121 - 127.

Spearman, T. and Butcher, F. 1982a. "Calcium and exocytosis, the rat parotid as a model. The role of calcium in biological systems, Vol. 2, Chapter 8, eds. Anghileri and Anghileri, CRC Press, Florida. p. 122 - 138.

Spearman, T., Durham, J. and Butcher, F. 1982b. "The role of cyclic AMP in the regulation of exocytosis in the rat parotid gland: evidence obtained with the isoproterenol analog PI-39". *J. of Cyclic Nucleotide Research* 8(4): 225-234.

Stadel, J., Nambi, P., Schorr, R., Sawyer, D., Caron, M. and Lefkowitz . 1983. "Catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the  $\beta$ -adrenergic receptor". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 80: 3173 - 3177.

Takahama, M. and Barka, T. 1965. "Ultrastructural alterations of submaxillary gland of rat produced by isoproterenol". Fed. Proc. 24: 428 (A).

Tanaka, T., Gresick, E. and Barka, T. 1981. "Immunocytochemical localization of amylase in the parotid gland of developing and adult rats". The J. of Histochemistry and Cytochemistry 29: 1189 - 1195.

Thiéry, J. and Rambourg, A. 1974. "Cytochimie des polysaccharides". J. Microscopie 21: 225 - 232.

Vaheri, A., Ruoslahti, E. and Nordling, S. 1972. "Neuraminidase stimulate division and sugar uptake in density-inhibited cell cultures". Nature New Biology 238: 211 - 212.

Warren, L. 1959. "The thiobarbituric acid assay of sialic acids". The J. of Biological Chemistry 234: 1971 - 1975.

Watkins, W. 1966. "Blood groups substance". Science 152: 172 - 180.

Wisher, M. and Evans, H. 1975. "Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane". J. Biochem. 146: 375-388.

## VII. APENDICE DE MATERIALES Y METODOS

1. Determinaciones químicas1.1 Proteínas

Se aplicó la técnica de Lowry y col. (1951). Alicuotas del homogeneizado se mezclaron con un volumen igual de NaOH 2 N y se incubaron en baño de agua a 60°C por 30 minutos. Posteriormente, se agregó 1.25 ml de cuprotartrato alcalino (tartrato de potasio 1%; CuSO<sub>4</sub> 1%; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%). Después de 10 min se agregó 0.25 ml de reactivo de Folin diluido 1:1 en agua destilada y deionizada. Se dejó 30 min a temperatura ambiente. Se midió densidad óptica a 550 nm con un espectrofotómetro de doble haz, Shimadzu UV-190.

La curva de calibración se hizo con albúmina sérica de bovino.

1.2 Determinación de la actividad  $\alpha$ -amilasa

Se empleó la técnica de Bernfeld (1955). Se preincubó 175  $\mu$ l de almidón libre de dextrinas al 1% en tampón Bernfeld en baño de agua a 20°C por 5 minutos. Luego se agregó 25  $\mu$ l del homogeneizado y se incubó otros 4 min a la misma

temperatura. Posteriormente, se agregó 200  $\mu$ l de ácido 3,5-dinitro salicílico (ADNS) (1 g de ADNS y 30 g de tartrato de Na y K en 50 ml de agua destilada y 20 ml NaOH 1 N; se completó a 100 ml con agua destilada) y se colocaron los tubos en hielo. Se agregó 1 ml de agua destilada, se mezcló y midió la densidad óptica del cromóforo formado a 540 nm (Schimadzu UV-190).

Se usó como referencia una solución de glucosa. Los resultados se expresaron como  $\mu$ moles de  $\beta$ -maltosa liberada por mg de proteína, en un min a 20°C.

### 1.3 ADN

#### 1.3.1 Extracción

Se empleó la técnica de Schneider (1957). Alicuotas de 1 ml de homogeneizado de acinos se mezclaron en frío con igual volumen de TCA 10% y se dejaron en reposo durante 10 minutos. Los tubos se centrifugaron a 1.000 x g por 10 min y los sedimentos resultantes se lavaron por resuspensión y centrifugación a 4°C, sucesivamente con volúmenes de 2 ml de: TCA 5%, etanol 80% y etanol-éter 3:1 (tres veces). Posteriormente, los sedimentos se suspendieron en TCA 5% y se incubaron en baño de agua a 90°C durante 20 min, al cabo de los

cuales se colocaron en un baño de agua-hielo por 5 minutos. A continuación, los tubos se centrifugaron a 1.000 x g durante 10 minutos. El ADN se determinó químicamente en el sobrenadante.

### 1.3.2 Determinación del contenido de ADN

Se aplicó la técnica de Burton (1956). Alicuotas de 125 y 250  $\mu$ l de los sobrenadantes obtenidos en 1.3.1 se mezclaron con volúmenes iguales de ácido perclórico (APC) 1 N y se llevaron a 1 ml con APC 0.5 N. A cada tubo se agregó 2 ml de solución de difenilamina\* y se dejaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 17 horas. Al cabo de este período se midió la densidad óptica a 600 nm (Schimadzu UV-190). Las curvas de calibración se realizaron con ADN de timo de ternera.

---

\* Solución de difenilamina: 1.5 gr de difenilamina cristalizada fueron disueltos en 100 ml de ácido acético glacial y mezclados poco antes de la reacción con 1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado y 0.5 ml de acetaldehído diluido en agua (16 mg/ml).

#### 1.4 Incorporación de timidina $-^3\text{H}$

Los acinos, estimulados con IPR  $10^{-5}$  M ó no estimulados, se lavaron 3 veces con solución Hanks, se colocaron en placas Falcon con 2 ml de medio M-199 y se llevaron a un incubador con atmósfera de aire/ $\text{CO}_2$  (95%/5%) mantenido a  $37^\circ\text{C}$ . A intervalos de 5 hrs, un triplicado de placas con acinos estimulados o no estimulados recibió timidina tritiada (1  $\mu\text{Ci/ml}$ , act. esp. 25 Ci/mmol) por 30 minutos. Luego, los acinos se lavaron 3 veces con tampón Bernfeld, centrifugando a  $670 \times g$  por 5 min cada vez. Una vez recogidas todas las muestras (5, 10, 15, 20 y 25 h) se homogeneizaron en la forma descrita en el punto 3.2 y el ADN se extrajo según la técnica de Schneider, descrita en 1.3.1. De los 2 ml de hidrolizado final se tomó una alícuota de 1 ml para el conteo de radioactividad y alícuotas de 125  $\mu\text{l}$  y 250  $\mu\text{l}$  para la medición del contenido de ADN.

La radioactividad se midió en 10 ml de un líquido de centelleo (PPO 0.5% y POPOP 0.05% disueltos en Tritón X-100/Xileno, 1:2 v/v) en un espectrómetro Beckman LC-100 con una eficiencia de 59%. Los resultados se expresaron en cpm de precursor radioactivo incorporado por mg de ADN celular.