

## Localización celular, vida media y secreción del péptido YY

F. Lluís\*, M. Fujimura, G. Gómez, J. A. Salvá\*\*, G. H. Greeley Jr y J. C. Thompson

Department of Surgery  
The University of Texas Medical Branch  
Galveston, Texas (USA)

(Recibido el 20 de febrero de 1989)

F. LLUIS, M. FUJIMURA, G. GOMEZ, J. A. SALVA, G. H. GREELEY Jr, and J. C. THOMPSON. *Cellular Localization, Half-Life, and Release of Peptide YY*. Rev. esp. Fisiol., 45 (4), 377-384, 1989.

Tissue and plasma concentration of peptide YY (PYY) were measured by means of a radioimmunoassay (RIA) developed in our laboratory, using a specific PYY antiserum generated in New Zealand white rabbits against synthetic PYY, and dextran-coated charcoal to terminate the assay. Cellular localization of PYY was studied immunohistochemically using the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique. The highest tissue concentration of PYY was found in the mucosa of the terminal ileum and colon. PYY-containing secretory granules were primarily found in the basal pole of open-type endocrine cells. Basal plasma concentration of PYY was  $70 \pm 9$  pg/ml and rose to  $357 \pm 30$  pg/ml during the IV administration of PYY at 400 pmol/kg-h. A significant correlation was found ( $r = 0.94$ ,  $p < 0.05$ ) between dose of PYY (12.5, 25, 50, 100, 200, 400 pmol/kg-h, IV) and plasma concentration of PYY. The calculated half-life of PYY in plasma was  $8.3 \pm 1.9$  minutes. Plasma concentration of PYY during the intraduodenal administration of sodium oleate ( $150 \pm 20$  pg/ml) or long-chain triglyceride ( $187 \pm 37$  pg/ml) was similar to plasma concentration of PYY obtained during the IV administration of PYY at 100 pmol/kg-h. Plasma concentration of PYY raised ( $126 \pm 10$  pg/ml) after the administration of bombesin (400 pmol/kg-h, IV). Bile enhanced release of PYY. The present study suggests a hormonal role for PYY.

**Key words:** Gastrointestinal Endocrinology, Peptide YY, Radioimmunoassay, Immunohistochemistry, Half-life, Release.

El péptido YY (PYY) fue el primero de una larga serie de péptidos descubierta recientemente por TATEMOTO y MUTT (15, 16) gracias a un método bioquímico diseñado para detectar radicales amidados en

extractos intestinales. La composición y la secuencia de aminoácidos del PYY se conocieron antes que sus acciones biológicas (10, 13). El PYY contiene 36 aminoácidos enlazados en serie, con sendas tirosinas en ambos extremos (9).

El objetivo del presente estudio fue averiguar la concentración tisular del PYY, y la estirpe celular que lo sintetiza y secreta; la concentración plasmática del PYY y su

\* A quien debe dirigirse la correspondencia: Cirugía General y Digestiva, Hospital Sta. Cruz y San Pablo, 08025 Barcelona (España)

\*\* Hospital Hermanos Trias i Pujol, Departamento de Cirugía, UAB, Barcelona 08028 (España)

vida media en plasma; y los factores que influyen sobre la secreción del PYY.

### Material y Métodos

Seis perros bastardos de ambos sexos (17-25 kg), mantenidos en ayunas durante 24 horas, fueron anestesiados con cloralosa (100 mg/kg) y desangrados con un catéter colocado en la arteria femoral. El tubo digestivo, desde el esófago al recto, se extirpó, se enfrió inmediatamente en hielo, se abrió longitudinalmente, y se lavó con suero fisiológico a 4° C. El intestino delgado, a partir del ángulo de Treitz, se dividió en seis segmentos (ye-yuno, 1, 2, y 3; ileon 1, 2, y 3). La mucosa se separó de la muscular y se pesó. Todos los tejidos se congelaron en hielo seco y, 5 horas después de su obtención, se descongelaron y se sometieron al proceso de extracción del PYY.

*Extracción del PYY.* — La extracción se efectuó con una modificación del método que emplea ácido-acetona. Los tejidos descongelados se homogeneizaron en seis volúmenes (peso/volumen) de ácido: acetona (acetona: ácido acético 0,6 N; 7:3) con un homogenizador Polytron (Brinkmann Instruments, Westbury, Nueva York). A continuación, los homogenizados se centrifugaron durante 15 min en una centrifuga refrigerada a 3.000 rpm, y los sobrenadantes se guardaron. Los sedimentos (o *pellets*) se resuspendieron dos veces en ácido: acetona, y todos los sobrenadantes se mezclaron y se secaron mediante un chorro de nitrógeno, en un baño de agua a 35° C. Los extractos secos se congelaron a -20° C. Antes del radioinmunoanálisis (RIA), los extractos se disolvieron (1:500) en el mismo tampón utilizado para el RIA del PYY.

*Radioinmunoanálisis (RIA) del PYY.* — Los niveles plasmáticos del PYY se midieron con un RIA sensible y espe-

cífico desarrollado en nuestro laboratorio. El anticuerpo anti-PYY se generó en conejos de Nueva Zelanda inmunizados con PYY porcino sintético (Peninsula Laboratories, Belmont, California). Las muestras de plasma (200 µl) y los controles se incubaron con el anticuerpo (a una dilución final de 1:80.000) a 4° C, durante 24 h, en tampón de fosfato potásico 0,01 M, que contenía CINA 0,15 M, azida sódica al 0,1 %, y BSA al 0,5 % (pH 7,5; volumen total 900 µl). Se añadió PYY marcado con iodo radioactivo (10.000 cpm, 100 µl) a la mezcla, y ésta se incubó durante otras 24 h. El PYY (5 µg) se marcó con I<sup>125</sup> (1 mCi) mediante un método descrito previamente (2,11). El PYY así marcado se purificó en una columna Sephadex G-50 (1 × 30 cm, Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey) y luego en una columna CF-11 (0,8 × 5 cm, Whatman, Clifton, N. J.). El RIA se finalizó al añadir 500 µl de una solución de carbón (recubierto con dextrano) enfriada en hielo (0,25 g de dextrano T-70, 2,5 g de carbón en 800 ml de solución fisiológica tamponada con fosfato). La sensibilidad fue 0,005 ± 0,001 ng/tubo, y la ID-50 (50 % de inhibición de la unión máxima de antígeno con el anticuerpo) fue 0,030 ± 0,005 ng/tubo. La ID-50 del polipéptido pancreático (PP) y del neuropéptido y (NPY) en este sistema fueron superiores a 10 ng/tubo. La recuperación del PYY (500, 250, 125, 62,5 y 31,25 pg/ml) añadido al plasma fue 80 ± 5 %. Tanto los extractos de mucosa colónica de perro, rata, o mono, como el plasma recolectado después de la infusión intraduodenal de grasa, dieron curvas de dilución paralelas al PYY control.

*Técnica de inmunohistoquímica.* — Las muestras de ileon de perro se fijaron en formalina al 10 %, se incluyeron en parafina, y se cortaron en secciones finas (1-2 µm) con la ayuda de un ultramicrotomo. Una vez desparafinadas, las secciones se depositaron en una laminilla de vidrio, se incubaron a temperatura ambiental con el

anticuerpo anti-PYY, diluido 1:5.000, y se tiñeron con el método de la peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) (3).

*Soluciones.* — El PYY, la secretina (Kabi Vitrium AB, Estocolmo), la colecistoquinina-8 (CCK-8; Bachem, Torrance, Ca), o la bombesina (Bachem), se disolvió en una mezcla de agua de la usada en cromatografía de alta presión (HPLC) y albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) al 0,1 %; se dividió en fracciones (1 mg/ml), y se almacenó a  $-20^{\circ}$  C. Inmediatamente antes de cada experimento, la cantidad necesaria de péptido se disolvió en solución fisiológica y BSA al 0,1 %, y se infundió IV mediante jeringa y línea separadas y una bomba de infusión continua (Harvard Apparatus, South Natick, Mass).

El ácido oleico (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, N. J.) se mezcló con OHNa (oleato sódico; 80, 180 mmol/l; pH 9,6) calentando la mezcla a  $55^{\circ}$  C. La fenilalanina y el triptófano (Calbiochem, Berhing Diagnostics, La Jolla, Ca) se disolvieron a una concentración equimolar (90 mmol/l; pH 7,0) en agua destilada, calentando la mezcla a  $45^{\circ}$  C. El ácido clorhídrico se preparó en agua destilada (180 mEq/l). La osmolaridad de estas soluciones se ajustó a  $300 \pm 5$  mOsm/l añadiendo CINA. La suspensión de triglicéridos de cadena larga (Lipomul, Upjohn, Kalamazoo, Michigan) se mezcló con solución fisiológica.

*Preparación de los animales y diseño experimental.* — Todos los perros se estudiaron en días separados siguiendo un orden aleatorio. Antes de cada experimento, se les mantuvo en ayunas durante 18 horas, pero se les permitió beber agua. Se les colocaron dos catéteres (19 GA, 1,1 mm  $\varnothing$  exterior) en sendas venas separadas de las patas traseras, para mantener una infusión IV de solución fisiológica.

En un primer ensayo, se administró PYY (12,5, 25, 50, 100, 200, 400 pmol/kg-h, IV) o bombesina (500 pmol/kg-h, IV)

a 6 perros intactos. Cada dosis se infundió durante 30 min, de menor a mayor, sin interrupción. Se tomaron muestras de plasma cada 15 minutos.

En un segundo ensayo, se administró PYY (400 pmol/kg-h, IV) durante 90 min a 6 perros intactos. Se tomaron muestras de plasma a los 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30 y 40 min de haber cesado la infusión. La vida media se calculó con la ecuación:  $T_{1/2} = \ln 2/K$ , donde K es la pendiente de la línea de regresión entre la concentración plasmática de PYY y el tiempo en minutos. La concentración plasmática de PYY se expresó en el % respecto al valor máximo alcanzado durante la infusión de PYY, después de haber sustraído de ambos valores el valor de la concentración basal.

Seis perros bastardos de ambos sexos (18-22 kg) se prepararon quirúrgicamente mediante la colocación de una cánula modificada de THOMAS (18) en la porción más declive del estómago, y una cánula duodenal en la segunda porción del duodeno. Los perros descansaron durante tres semanas después de la intervención. En el día del experimento, se abrieron las cánulas y se limpió el estómago y el duodeno con solución fisiológica templada. Las soluciones se infundieron en el duodeno a 100 ml/h con una bomba Harvard; el ácido clorhídrico se infundió a 150 ml/h. En un tercer ensayo, y en la situación de flujo normal de bilis hacia el duodeno, estos perros recibieron una infusión intraduodenal de: oleato sódico (18 mmol/h); aminoácidos (90 mmol/L); CIH (27 mEq/h); o triglicéridos de cadena larga (2 g/kg-h). En un cuarto ensayo, estos mismos perros recibieron una infusión intraduodenal de oleato sódico (18 mmol/h), en la situación de flujo normal de bilis hacia el duodeno (control), o después de la inserción de una sonda en el coledoco para recoger toda la bilis producida y drenarla al exterior (derivación biliar) según un método descrito previamente (4).

El plasma se recolectó a intervalos re-

gulares en tubos enfriados en hielo, que contenían 15 U/ml de heparina sódica (Liquaemin, Organon, West Orange, N. J.) y 100 U/ml de aprotinin (Trasylol, Novo Research Institute, Copenhagen). El plasma se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la medición de la concentración de PYY.

**Análisis de resultados.** — Los resultados se expresaron con la media  $\pm$  un error estándar de la media (SEM). El promedio de dos mediciones basales se tomó como basal. La relación entre la dosis de PYY administrada exógenamente y la concentración plasmática de PYY obtenida con RIA, se determinó con el método de regresión lineal según los cuadrados mínimos. Las correlaciones se estudiaron con el método de SPEARMAN (14). La comparación entre la concentración plasmática basal y la estimulada de PYY, y entre la secreción integrada de PYY y el valor cero, se analizó con la prueba de la *t* de Student (12). La secreción integrada de PYY se calculó según un método descrito previamente (19) y se expresó en  $\text{ng} \times \text{min}/\text{ml}$ . El efecto del jugo pancreático sobre la secreción integrada de PYY, se analizó con la prueba de Wilcoxon. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo.

## Resultados

**Concentración tisular de PYY.** — La concentración de PYY aumentó en sentido distal en el tubo digestivo. La mucosa de ileon terminal y del colon contenía la máxima concentración tisular de PYY (fig. 1) que, por el contrario, fue mínima en el esófago, estómago, páncreas, y en las capas musculares del tubo digestivo (datos no mostrados).

**Localización de las células productoras de PYY.** — La técnica inmunohistoquímica de tinción con peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) y el anticuerpo anti-PYY, reveló unas células que se tiñen positiva-

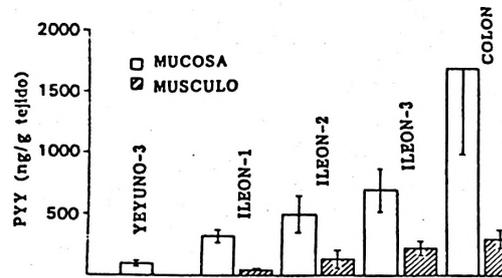


Fig. 1. Concentración tisular del PYY en el intestino delgado distal y en el colon del perro. □, mucosa; ▨, músculo.

mente en la mucosa del ileon, las cuales almacenan los gránulos de secreción en el polo basal, y alcanzan la luz intestinal con el polo apical (fig. 2).

**Concentración plasmática y vida media del PYY.** — La concentración basal del PYY ( $70 \pm 9$  pg/ml) aumentó en relación

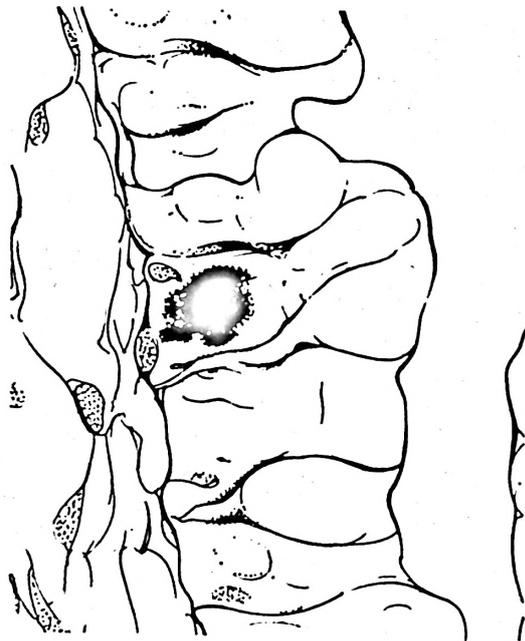


Fig. 2. Célula endocrina del tipo abierto: almacena gránulos de secreción en el polo basal y alcanza la luz intestinal con su polo apical ( $\times 360$ ).

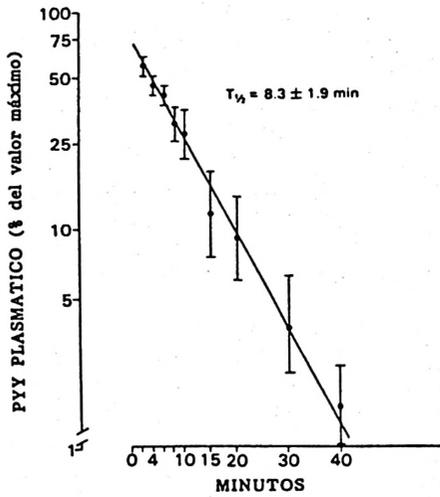


Fig. 3. Vida media del PYY al suspender la infusión IV de PYY a 400 pmol/kg-h. N = 6 perros.

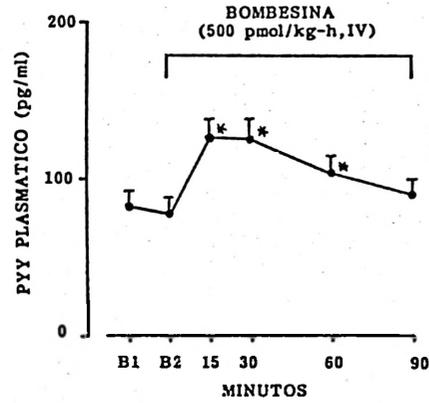


Fig. 5. Elevación de la concentración plasmática de PYY por infusión IV de bombesina.

\* = p < 0.05 vs basal; N = 6 perros.

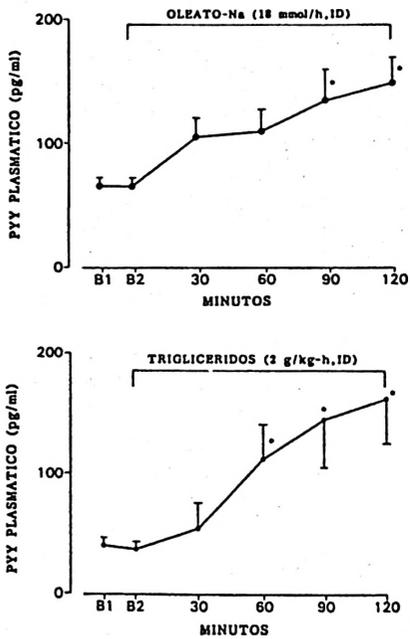


Fig. 4. Elevación de la concentración plasmática de PYY por infusión intraduodenal (ID) de oleato sódico (superior; N = 6 perros) o triglicéridos de cadena larga (inferior; N = 5 perros).

\* = p < 0.05 vs basal.

directa a la dosis de PYY administrada exógenamente. El análisis de regresión lineal mostró una correlación positiva ( $r = 0.94$ ;  $p < 0.05$ ) entre la dosis de PYY y la concentración plasmática de PYY. La administración de PYY (400 pmol/kg-h) IV; elevó la concentración plasmática de PYY a  $357 \pm 30$  pg/ml; la concentración alcanzó un nivel estable al cabo de 45 minutos y a los 90 min, cuando se interrumpió la administración, la vida media calculada del PYY fue  $8.3 \pm 1.9$  minutos (fig. 3).

*Efecto de la grasa, los aminoácidos, el ácido clorhídrico, y la bombesina sobre la secreción de PYY.* — La concentración plasmática de PYY aumentó significativamente durante la segunda hora de infusión ID de grasa: alcanzó  $150 \pm 20$  pg/ml durante la infusión de oleato sódico (fig. 4, superior), y  $187 \pm 37$  pg/ml durante la infusión de triglicéridos de cadena larga (fig. 4, inferior). Estos valores fueron similares a los obtenidos durante la administración IV de PYY a 100 pmol/kg-h. Por el contrario, la infusión de aminoácidos o CIH no modificó la concentración plasmática de PYY (datos no mostrados).

Tabla I. Efecto de la bilis endógena sobre la secreción plasmática de péptido YY (pg/ml) estimulada con grasa.

Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media; DB = derivación biliar;  
\* =  $p < 0.05$  v.s. DB.

|         | Tiempo (min) |              |              |              |               |               |               |
|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
|         | Basal        | 15           | 30           | 60           | 90            | 120           | 150           |
| Control | 85 $\pm$ 13  | 115 $\pm$ 21 | 177 $\pm$ 35 | 218 $\pm$ 35 | 259 $\pm$ 35* | 279 $\pm$ 38* | 254 $\pm$ 36* |
| DB      | 77 $\pm$ 6   | 101 $\pm$ 8  | 139 $\pm$ 16 | 183 $\pm$ 21 | 181 $\pm$ 16  | 162 $\pm$ 15  | 116 $\pm$ 10  |

La administración de bombesina elevó rápidamente la concentración plasmática de PYY, que alcanzó  $126 \pm 10$  pg/ml a los 15 minutos (fig. 5).

*Efecto de la bilis endógena sobre la secreción de PYY estimulada con grasa.* — La infusión ID de oleato sódico elevó la concentración plasmática de PYY, con independencia de la presencia o ausencia de bilis en la luz intestinal (tabla I). La concentración plasmática de PYY aumentó en mayor medida en presencia de bilis (control) que durante derivación biliar. La infusión de bilis sola no modificó la concentración plasmática de PYY (datos no mostrados).

### Discusión

El presente estudio demuestra que la concentración tisular de PYY en el perro es máxima en la mucosa del intestino distal; en la rata y en el mono, la distribución tisular de PYY es similar a la del perro (8). El PYY se almacena en el interior de típicas células endocrinas que contienen gránulos de secreción en el polo basal —cerca de la membrana basal y de los capilares— y cuyo polo apical alcanza la luz intestinal. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los estímulos nutritivos intraluminales pueden estimular la secreción de PYY al interior del torrente circulatorio.

Los resultados muestran que la vida me-

dia del PYY en el perro ( $8,3 \pm 1,9$  minutos) es similar a la de otros péptidos intestinales, tales como el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) (20) y el polipéptido pancreático (17), y es similar a la vida media del PYY en el hombre ( $9.1 \pm 0.3$  minutos) (1). Por su breve vida media, se adivina que el PYY experimenta un catabolismo intenso o una excreción rápida, o ambos.

La concentración plasmática de PYY fue  $70 \pm 9$  pg/ml en situación basal. La infusión de PYY exógeno aumentó, de forma proporcional a la dosis, la concentración plasmática de PYY. La infusión de grasa (ácidos grasos o triglicéridos) en el duodeno aumentó la concentración plasmática de PYY; ésta alcanzó valores máximos —similares a los obtenidos con la administración IV de PYY a 100 pmol/kg-h— durante la segunda hora de infusión. Por el contrario, la infusión de otros nutrientes esenciales, tales como aminoácidos o ácido clorhídrico en el duodeno, no modificó la concentración plasmática basal de PYY. Se desconoce, sin embargo, si estos nutrientes estimulan la secreción de PYY en pacientes con malabsorción o intestino corto.

La bombesina, también llamado péptido estimulador de la secreción de gastrina, actúa como neurotransmisor en la mucosa y en los ganglios de la submucosa a lo largo del tubo digestivo (7) y estimula la secreción de muchos péptidos intestinales. También estimula la secreción de PYY en el perro, pero se desconoce si actúa direc-

tamente sobre las células endocrinas o a través de neuronas intermedias.

Este estudio demuestra que la bilis endógena favorece la secreción de PYY estimulada con nutrientes; que la bilis sola no la estimula ni es necesaria para que los nutrientes la estimulen. Estos resultados y otros previos (5,6) sugieren que la bilis puede actuar como modulador fisiológico de la secreción de varias hormonas intestinales.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen a Mrs. F. L. Hill, Mr. R. Washington, y Mr. J. Trowbridge su asistencia técnica, y a Mrs. K. Lee y Miss M. L. Mraz su colaboración en la preparación del manuscrito. El trabajo ha sido sufragado, en parte, con las ayudas a la investigación RO1 DK 15421, y PO1 DK 35608 de los *National Institutes of Health*, y a la ayuda RG 0014/89 de la OTAN para la colaboración internacional en investigación.

#### Resumen

Se mide la concentración tisular y plasmática del PYY con un radioinmunoanálisis (RIA) que utiliza un anticuerpo específico, obtenido al inyectar PYY sintético a conejos de Nueva Zelanda, y carbón (éste separa la fracción radioactiva libre de la unida al anticuerpo). La localización celular del PYY se estudia mediante inmunohistoquímica con la técnica de la peroxidasa anti-peroxidasa (PAP). La concentración tisular del PYY es máxima en la mucosa del ileon terminal y del colon. Los gránulos de secreción se encuentran agrupados en el polo basal de unas células endocrinas de tipo abierto, es decir, que alcanzan la luz del intestino. La concentración plasmática basal del PYY ( $70 \pm 9$  pg/ml) aumenta a  $357 \pm 30$  pg/ml durante la administración de PYY a 400 pmol/kg-h, IV. Se encuentra una correlación significativa ( $r = 0.94$ ;  $p < 0.05$ ) entre la dosis de PYY (12.5, 25, 50, 100, 200, 400 pmol/kg-h, IV) y su concentración plasmática. La vida media del PYY en plasma es  $8,3 \pm 1,9$  minutos. La concentración plasmática de PYY durante la infusión intraduodenal de oleato sódico ( $150 \pm 20$  pg/ml) o triglicéridos de cadena larga ( $187 \pm 37$  pg/ml) es similar a la que se obtiene con la administración IV de PYY a 100 pmol/kg-h. La concentración plasmática de PYY también aumenta ( $126 \pm 10$  pg/ml) al administrar bombesina (400 pmol/kg-

h, IV). La bilis facilita la secreción de PYY. Según este estudio, el PYY podría ser una hormona.

Palabras clave: Endocrinología digestiva, Péptido YY, Radioinmunoanálisis, Inmunohistoquímica, Vida media, Secreción.

#### Bibliografía

1. Adrian, T. E., Savage, A. P., Sagor, G. R., Baccarese-Hamilton, A. J., Polak, J. M. y Bloom, S. R.: *Dig. Dis. Sci.*, 29, 3 S (abstract). 1984.
2. Fraker, P. J., y Speck, J. C., Jr: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 849-857, 1978.
3. Fujimura, M., Hancock, M. B. y Greeley, G. H. Jr. En «Gastrointestinal Endocrinology» (Thompson J. C., Greeley, G. H. Jr., Rayford, P. L. y Townsend, C. M. Jr, eds.) McGraw-Hill Book Co, Nueva York, 1987. pp. 10-25.
4. Gómez, G.: En «Gastrointestinal Endocrinology» (Thompson, J. C., Greeley, G. H. Jr, Rayford, P. L. y Townsend, C. M. Jr, eds.) McGraw-Hill Book Co, Nueva York, 1987, pp. 61-63.
5. Gómez, G., Lluís, F., Guo, Y.-S., Greeley, G. H. Jr, Townsend, C. M. Jr, Thompson, J. C.: *Surgery*, 100, 363-368, 1986.
6. Gómez, G., Lluís, F., Ishizuka, J., Draviam, E. J., Uchida, T., Greeley, G. H. Jr y Thompson, J. C.: *Surgery*, 102, 195-199, 1987.
7. Greeley, G. H. Jr. y Newman, J.: En «Gastrointestinal Endocrinology» (Thompson, J. C., Greeley, G. H. Jr, Rayford, P. L. y Townsend, C. M. Jr, eds) McGraw-Hill, Nueva York, 1987 pp. 322-329.
8. Greeley, G. H. Jr, Trowbridge, J., Hill, F. L. C. y Thompson, J. C.: *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 64 (Suppl July), 88, 1986.
9. Lluís, F.: En «Gastrointestinal Endocrinology» (Thompson, J. C., Greeley, G. H. Jr, Rayford, P. L. y Townsend, C. M. Jr, eds.) McGraw-Hill Book Co, Nueva York, 1987, pp. 429-433.
10. Sakamoto, T. y Greeley, G. H. Jr.: En «Gastrointestinal Endocrinology» (Thompson, J. C., Greeley, G. H. Jr, Rayford, P. L. y Townsend, C. M. Jr, eds.) McGraw-Hill, Nueva York, 1987, pp. 332-337.
11. Salacinski, P. R. P., McLean, C., Sykes, J. E. C., Clement-Jones, V. V., y Lowry, P. J.: *Anal. Biochem.*, 117, 136-146, 1981.
12. Snedecor, G. W. y Cochran, W. G.: *Statistical*

- Methods (7th ed.). The Iowa State University Press. Ames, 1980.
13. Solomon, T. E.: *Gastroenterology*, 88, 838-844, 1985.
  14. Spearman, C.: *Am. J. Psychol.*, 15, 72-101, 1904.
  15. Tatemoto, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2514-2518, 1982.
  16. Tatemoto, K. y Mutt, K.: *Nature*, 285, 417-418, 1980.
  17. Taylor, I. L., Solomon, T. E., Walsh, J. y Grossman, M. I.: *Gastroenterology*, 76, 524-528, 1976.
  18. Thomas, J. E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 46, 260-261, 1941.
  19. Thompson, J. C., Reeder, D. D., Bunchman, H. H., Becker, H. D. y Brandt, E. N. Jr: *Ann. Surg.*, 176, 384-393, 1972.
  20. Wolfe, M. M. y McGuigan, J. E.: *Gastroenterology*, 83, 864-872, 1982.