

LOCALIZACION INMUNOCITOQUIMICA DEL POLIPEPTIDO PANCREATICO HUMANO POR MICROSCOPIA DE LUZ Y ELECTRONICA

G. ESCOVAR, G. URIBE, D. CORREDOR

Avances recientes en inmunomicroscopía de luz y electrónica han hecho posible la localización de una nueva hormona en el páncreas de varias especies estudiadas: el polipéptido pancreático (PP). En el presente estudio mediante el método de peroxidasa antiperoxidasa (PAP), fue posible identificar el polipéptido pancreático humano (PPH) en cortes embebidos en parafina y en cortes ultrafinos pretratados con saponina de un insulinoma humano. Se describen, además, los efectos fisiológicos y farmacológicos y la expresión clínica de esta nueva hormona.

INTRODUCCION

A la familia actual de hormonas pancreáticas tales como la insulina, el glucagón

y la somatostatina, se adiciona una nueva hormona constituida por un residuo proteico de 36 aminoácidos dispuestos en cadena recta al cual se le ha denominado polipéptido pancreático (PP) (1).

Fue aislado por primera vez del páncreas de aves durante la purificación de la insulina y se le denominó polipéptido pancreático aviario (PPA) (2); posteriormente, fue encontrado en el páncreas porcino (PPP) (3), ovino (PPO) (4), bovino (PPB) (5) y humano (PPH) (6).

Los polipéptidos pancreáticos de aves y mamíferos difieren entre sí en la secuencia de sus aminoácidos. Sin embargo, todos comparten la presencia del grupo tirosina en el residuo amino-terminal de la posición 36 (7). En el páncreas de aves y mamíferos, las células productoras de PP se han detectado inmunocitoquímicamente situadas hacia la periferia de los islotes de Langerhans (8-10). Estas células difieren histoquímica e inmunocitoquímicamente de las células alfa productoras de glucagón, de las beta de insulina y de las delta de somatostatina (11). También, es posible en-

Dra. Genarina Escovar V.: Profesora Asistente, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; actualmente en entrenamiento: Department of Pathology, M.D. Anderson Hospital and Tumor Research Institute, Texas Medical Center, Houston, Texas, E.U.A.; Dr. Gonzalo Uribe Botero: Profesor Asistente, Department of Pathology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Staff Pathologist, Veterans Administration Hospital, Medical Center, Houston, Texas, E.U.A.; Dr. Daniel Corredor: Medicina Interna y Endocrinología, Houston, Texas, E.U.A.

Solicitud de separatas al Dr. Uribe.

contrar células productoras de polipéptido pancreático (PP), en tejidos normales distribuidas en el parénquima exocrino pancreático (12), en la mucosa gástrica (13), y en duodeno, íleon, colon y recto (14,15).

Estudios ultraestructurales empleando el método inmunocitoquímico de peroxidasa antiperoxidasa (PAP), han permitido la detección del polipéptido pancreático en granulos citoplasmáticos electrodensos de las células PP (10).

En el presente estudio se informa la detección inmunocitoquímica tanto por microscopía de luz como electrónica, del PPH contenido en células endocrinas pancreáticas tumorales. Además, se analizan las acciones fisiológicas y farmacológicas y los efectos biológicos de esta nueva hormona tanto en condiciones normales como patológicas.

MATERIAL Y METODOS

Microscopía de luz. El tejido pancreático tumoral fue obtenido de un in-sulinoma humano, fijado en formol al 10% y embebido en parafina.

En la detección inmunocitoquímica del tumor se utilizó el método de peroxidasa antiperoxidasa (PAP) de Sternberger (16), descrito detalladamente por Escovar et al. (17). Los cortes histológicos del tumor fueron expuestos consecutivamente a los siguientes antisueros, verificándose lavados con solución tamponada tris (17) después de cada período de incubación; primer antisuero: IgG de conejo antipolipéptido pancreático, incubado durante 24 horas a 4°C (The Lilly Lab. Co., Indiana, EUA); segundo antisuero: IgG de cabra anticonejo, incubado media hora a 37°C (Cappel Lab., Pa., EUA); tercer antisuero: complejo inmune compuesto por moléculas de IgG antiperoxidasa unidas a moléculas de peroxidasa. Este antisuero fue preparado en conejos e incubado media hora a 37°C (Cappel Lab.). También, se realizó por separado la detección inmunocitoquímica

para la insulina, tratando los tejidos con suero de cobayo antiinsulina (Institute Pasteur, Francia) e IgG de cabra anticobayo conjugada con peroxidasa (Cappel Lab.).

Se utilizaron en la prueba dos controles, uno consistió en la sustitución del suero antipolipéptido pancreático por suero preimmune. También se realizó adsorción del suero antipolipéptido pancreático con el polipéptido pancreático (The Lilly Lab.), utilizándose el suero así tratado en la prueba PAP (18).

La reacción PAP fue revelada con 3'3 diaminobenzidina al 0,05% y peróxido de hidrógeno al 30% (17). Finalmente, los tejidos fueron teñidos con hematoxilina de Harris, sometidos a deshidratación en gradientes ascendentes de etanol, clarificados en xilol y montados en permount. Se utilizó un microscopio de luz con cámara fotográfica incorporada para la lectura de los tejidos.

Microscopía electrónica. Preparación y fijación de los tejidos. Con el objeto de demostrar el polipéptido pancreático intracelular a nivel ultraestructural y facilitar la penetración de los anticuerpos utilizados en la prueba PAP, se utilizó el método descrito por Bohn (19) con algunas modificaciones. La metodología utilizada consistió esencialmente en lo siguiente:

1. El tumor pancreático fue cortado en fragmentos aproximadamente de 1 mm de espesor, los cuales fueron lavados en solución tamponada de fosfatos al 0,02M, pH 7,3 y 300 mOs(20).

2. Los tejidos fueron posteriormente fijados durante 5 minutos a 4°C en solución tamponada de fosfatos pH 7,3, la cual contenía una mezcla de saponina al 0,05% (N° 1252, Sigma Co., St. Louis, Mo., EUA) y glutaraldehído al 0,05% (grado E.M. N° 216, Polysciences, NC, Penn., EUA). Inmediatamente los tejidos fueron postfijados durante 45 minutos a

4° C en solución tamponada de fosfatos pH 7,3 conteniendo una mezcla de glutaraldehído al 0,05% y paraformaldehído al 1% (19).

Después de la fijación y con el objeto de obtener cortes más finos del tejido, los fragmentos se colocaron en el compuesto OCT (Tissue-Tek II, Lab. Tek Products, Illinois, EUA) siendo cortados en un crióstato para cortes por congelación. Se realizaron cortes de 4 micras de espesor. Las secciones fueron recogidas en solución tamponada de fosfatos en frascos de 2 ml de capacidad dejando flotar libremente el tejido en el líquido durante 5 minutos.

Método de peroxidasa antiperoxidasa para microscopía electrónica. Después de la fijación, se realizó el método PAP utilizando la misma secuencia de tres antisueros descrita para la microscopía de luz, con posterior desarrollo de la reacción con 3'3 diaminobenzidina al 0,05% preparada en solución tamponada tris pH 7,6 (100 ml) más 30 microlitros de H₂O₂ al 30%, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos fueron lavados con solución tris quedando en esta forma listos para el proceso de microscopía electrónica. Durante el desarrollo del método PAP, se dejaron flotar los tejidos en las soluciones utilizadas, realizándose el cambio de sustancias con pipetas Pasteur.

Proceso de postfijación e inclusión en epón-araldita. Posterior a la realización del método PAP, los tejidos fueron postfijados en tetróxido de osmio al 2% durante 90 minutos, deshidratados y embebidos en epón-araldita según el método descrito por Escovar et al. (17, 21). Se obtuvieron cortes ultrafinos de áreas seleccionadas, realizándose el estudio de ultraestructuras en un microscopio Phillips, modelo 301. Se anota que para los propósitos del presente estudio (demostración inmunocitoquímica de material intracitoplasmático) no se realizó

la coloración de cortes de tejido con acetato de uranilo ni con citrato de plomo.

RESULTADOS

Hallazgos inmunocitoquímicos. Microscopía de luz. Mediante el uso de la técnica de PAP, empleando suero antipolipéptido pancreático, fue posible detectar en forma clara y con gran especificidad la localización de la hormona en el neoplasma estudiado. Al microscopio de luz, la reacción se caracteriza por la formación de un precipitado de color café oscuro, el cual es evidente en el citoplasma celular. La intensidad del color parece ser proporcional a la cantidad de hormona acumulada en el citoplasma celular. Sólo las células productoras de la hormona fueron inmunorreactivas, siendo negativos los demás tipos celulares existentes en el tejido, lo cual indica una gran especificidad de la reacción inmunocitoquímica PAP. Las Figuras 1A, 1B, 1C, ilustran la reacción PAP positiva en la detección del PP en células tumorales del páncreas.

Al utilizarse suero antipolipéptido pancreático adsorbido con la hormona homóloga, se obtuvo una reacción PAP negativa en las células tumorales estudiadas. También se obtuvieron resultados negativos en la reacción PAP al reemplazar el suero antipolipéptido pancreático por suero preinmune. El neoplasma estudiado también presentó inmunorreacción PAP positiva al utilizarse el suero antiinsulina humana.

Hallazgos inmunocitoquímicos. Microscopía electrónica. Las células productoras del PP se caracterizan ultraestructuralmente por presentar gránulos citoplasmáticos electrodensos, los cuales presentan diámetros entre 150 y 170 nanómetros. Algunos de estos gránulos están caracterizados por presentar una zona central electrodensa rodeada de un halo periférico y una membrana limitante externa (22). La forma de los gránulos es redonda, aunque algunos pueden ser ligeramente ovalados.

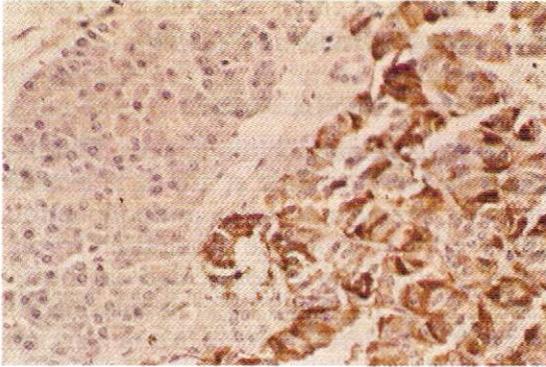


Figura 1A. Nótese la presencia de una reacción marcadamente positiva para la hormona polipéptido pancreático humano (PPH) en la zona tumoral (PAP, 25X).

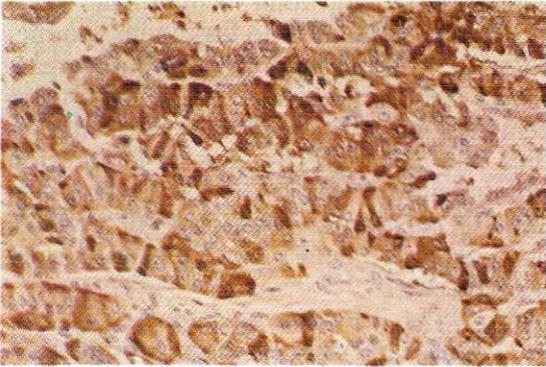


Figura 1B. Nótese la reacción de peroxidasa antiperoxidasa (PAP) fuertemente positiva para el PPH en una zona de marcado compromiso tumoral (25X).

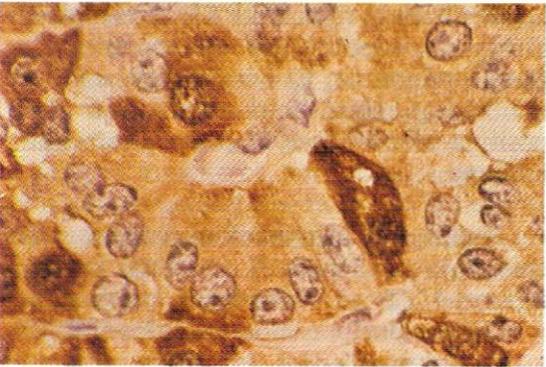


Figura 1C. Detalle a gran aumento de la fuerte positividad citoplasmática para el PPH (PAP, 100X).

Además de los gránulos secretorios, estas células presentan núcleos ovoides, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y ribosomas libres en el citoplasma.



Figura 2. Nótese la presencia de gránulos citoplasmáticos (GC) electrodensos e inmunorreactivos para el PPH en una célula pancreática tumoral. Técnica PAP aplicada a microscopía electrónica (11.250X).

La Figura 2 ilustra en una célula endocrina pancreática tumoral varios de estos hallazgos ultraestructurales. Mediante la técnica de PAP aplicada a la microscopía electrónica, sólo las ultraestructuras inmunorreactivas aparecen electrodensas, siendo las demás electrolúcidas en la electromicrografía con lo cual se facilita la visualización específica de la hormona PP en los gránulos secretorios citoplasmáticos.

DISCUSION

En el presente estudio la utilización del método inmunocitoquímico PAP aplicado tanto a microscopía de luz como electrónica, hizo posible la detección específica del PPH, localizado en el citoplasma de células pancreáticas endocrinas tumorales. Estos hallazgos confirman lo encontrado por otros autores (23, 24) en estudios similares tanto en tejido pancreático normal como tumoral.

Los resultados positivos en la detección del PP a nivel ultraestructural, demuestran

la eficacia del método de Bohn (19) para facilitar la penetración de anticuerpos a través de las membranas celulares, y para preservar la morfología celular mediante el empleo de glutaraldehído y paraformaldehído en las concentraciones indicadas. Es difícil explicar el efecto sinérgico de la mezcla saponina-glutaraldehído sobre las membranas celulares, ya que la interacción molecular de la saponina sobre éstas no está bien entendida. Los estudios que emplean la técnica de grabado o réplica por congelación (25), han demostrado la presencia de pequeños agujeros en la membrana de eritrocitos, luego del tratamiento con saponina al 0,01%. Vistos al microscopio electrónico, estos agujeros presentan diámetros de 4 a 5 nanómetros, y se encuentran localizados en la superficie externa de la membrana celular. Es probable que su presencia facilite la penetración de anticuerpos cuando se emplean técnicas inmunocitoquímicas. El método de fijación de tejidos para estudios de inmunoelectromicroscopía descrito en el presente trabajo, constituye un modelo aplicable en la detección de gran variedad de antígenos y productos intracitoplasmáticos (26).

La negatividad de la reacción PAP al reemplazar el suero antipolipéptido pancreático por suero preinmune, o al adsorberlo con su hormona específica (PP), comprueban la monoespecificidad del antisuero utilizado.

En el pasado, los esfuerzos hechos para identificar las células productoras de PP a nivel ultraestructural en diferentes especies estudiadas, llevaron a la descripción conflictiva de células con variadas características morfológicas, quizás relacionadas con diferencias de interespecies. Este tipo de células fueron agrupadas bajo el nombre de células pancreáticas F según la clasificación de Weisbaden (27), caracterizándose por presentar gránulos citoplasmáticos irregulares con densidades electrónicas variables; su tamaño y forma de acuerdo a la especie considerada (28, 29). En el hombre

y en otras especies, las células F no han podido ser identificadas. Sólo con el uso de la inmunoelectromicroscopía se pudieron caracterizar con certeza las células productoras del PP, siendo la característica más distintiva la presentación de gránulos citoplasmáticos inmunorreactivos y con diámetros de 150 a 170 nanómetros (22).

Las acciones fisiológicas y farmacológicas del PPH han sido extensamente estudiadas, no así la expresión clínica de sus efectos biológicos, la cual aún permanece sin esclarecerse completamente. En base a las acciones farmacológicas, el PPH parece actuar generalmente en oposición a la función de la colecistoquinina-pancreozimina, es decir, inhibiendo la secreción pancreática exocrina y la excreción biliar (7, 30).

Ha sido posible obtener una considerable información sobre los efectos fisiológicos del PP debido a su carácter fuertemente antigénico, estabilidad en el plasma y fácil lectura de los niveles plasmáticos mediante pruebas de radioinmunoensayo. La secreción fisiológica del PP se produce normalmente como respuesta a la ingestión de alimentos, sin tener ningún efecto los alimentos suministrados intravenosamente. De los constituyentes nutricionales, las proteínas parecen tener el mayor efecto sobre su secreción, mientras que las grasas y carbohidratos ejercen efectos moderados. Floyd et al. (31) encontraron incrementos del PPH de 150 pmol/l de plasma, después de una ingestión de 500 g de carne cocida. En personas normales, bajo condiciones de ayuno, los niveles plasmáticos de PPH oscilan entre 10 y 50 pmol/l de plasma, registrándose un incremento con la edad (7).

Al compararse los niveles plasmáticos del PPH en ambos sexos, se encontraron niveles significativamente mayores en los hombres (32). Además de la ingestión de alimentos, la secreción de PPH está aumentada en condiciones hipoglicémicas

(aumento de insulina), registrándose un efecto inhibitorio de la secreción con estados de hiperglicemia. Según Floyd (33), tales acciones podrían estar mediadas por mecanismos vagales, de los cuales los colinérgicos incrementan la secreción de la hormona. El carácter predominantemente hormonal del PPH ha sido comprobado por la ausencia de niveles plasmáticos del mismo en individuos pancreatomizados. hallazgos similares se han detectado en animales de experimentación (34).

Los niveles plasmáticos basales de PPH se encuentran elevados en los diabéticos y su aumento parece ser proporcional a la severidad de la diabetes (33). En los páncreas de diabéticos juveniles se ha encontrado hiperplasia de las células productoras de PPH y en un menor grado en los páncreas de diabéticos de tipo adulto (35). Baetens encontró la misma alteración en los páncreas de ratones diabéticos (8, 36).

Siendo el PPH producido en células específicas, cualquier alteración de la población celular, ya sea pérdida de la sensibilidad al estímulo, o capacidad alterada para su secreción, se reflejará en concentraciones anormales de la hormona en el plasma. Clínicamente el PPH parece estar también involucrado en el proceso digestivo. Sin embargo, existen pocos ejemplos en los cuales se puedan asociar los síntomas directamente con niveles séricos elevados de la hormona. En el síndrome diarreico acuoso o síndrome de Verner y Morrison (cólera pancreática), dos polipéptidos han sido detectados con niveles marcadamente elevados en el plasma; uno es el PPH y el otro es el polipéptido intestinal vasoactivo (PIV) (23). Friesen et al (37), han informado el caso de un paciente con cuadro clínico de diarrea acuosa severa asociada a hiperplasia de células pancreáticas, predominantemente del tipo de células PPH. En tumores pancreáticos como los insulinosomas, glucagonomas, gastrinomas y en tumores productores del PIV (38), así como en tumores carcinoides (39), se han

detectado niveles elevados del PPH tanto en los tejidos como en el suero.

En el presente estudio, las células tumorales pancreáticas examinadas también presentaron inmunorreacción positiva para la insulina, lo cual nos lleva a concluir que el tumor era mixto en su producción hormonal. No se realizó identificación inmunocitoquímica de las células beta productoras de insulina a nivel ultraestructural; sin embargo, estas células fueron identificadas por métodos histoquímicos de rutina, por inmunocitoquímica para microscopía de luz y por microscopía electrónica tradicional. Son sumamente raros los tumores puros en la producción de PP, sin embargo, algunos de ellos han sido informados en la literatura (22,40).

A pesar de los adelantos en la detección inmunocitoquímica del PPH, aún no se ha podido atribuir un síndrome clínico específico a los excesos de la producción de esta nueva hormona, lo cual sugiere la necesidad de futuras investigaciones para poder establecer dicha correlación.

SUMMARY

Recent advances in light immunocytochemistry and immunoelectromicroscopy have made it possible to identify a new pancreatic endocrine hormone, the pancreatic polypeptide (PP), in several species. The unlabeled peroxidase anti-peroxidase (PAP) method was used to localize the human pancreatic polypeptide (HPP) within paraffin embedded sections and ultrathin sections pretreated with saponin from a human insulinoma. The physiologic, pharmacological, and clinical expression of this new hormone are also described.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— KIMMEL JR, HAYDEN LJ, POLLOCK HG. Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone. *J Biol Chem* 1975; 250: 9369-9376.
- 2.— KIMMEL JR, POLLOCK HG, HAZELWOOD RL. Isolation and characterization of chicken insulin. *Endocrinology*, 1968; 83: 1323.

- 3.— CHANCE RE, JONES WE. Polypeptide from bovine, ovine, human and porcine pancreas. U.S. Patent N° 3, 842, 063.
- 4.— LANGSHOW DR, KIMMEL JR, POLLOCK HG. Studies of the distribution of a new avian pancreatic polypeptide and insulin among birds, reptiles, amphibians and mammals. *Endocrinology* 1973; 93: 558-565.
- 5.— TSUNG-MIN L, CHANCE RE. Spectrum of gastrointestinal actions of bovine PP. En: BLOOM SR, GROSSMAN MI, Eds. *Gut Hormones*. Edinburgh: Churchill Livingstone 1978: 242-246.
- 6.— LARSON LI, SUNDLER F, HAKANSON R. Immunohistochemical localization of human pancreatic polypeptide (HPP) to a population of islet cells. *Cell Tiss Res* 1975; 156:167-171.
- 7.— TSUNG-MIN L. Pancreatic polypeptide: isolation, chemistry and biological function. En: JERZY GLASS GB. *Gastrointestinal hormones*, ed. New York: Raven Press; 1980: 275-306.
- 8.— BAETENS D, DEMEY J, GEPTS W. Immunohistochemical and ultrastructural identification of the pancreatic polypeptide producing cell (PP cell) in the human pancreas. *Cell Tiss Res* 1977; 185: 239-246.
- 9.— BERGSTROM BH, LOO S, HIRSCH HJ, et al. Ultrastructural localization of pancreatic polypeptide in human pancreas. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 44: 795-798.
- 10.— LARSON LI, SANDLER F, HAKESON R. Pancreatic polypeptide. A postulated new hormone. Identification of its cellular storage site by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Diabetologia* 1976; 12: 211.
- 11.— YOGESHWARD, O'BRIAN DS. The pathology of the pancreatic endocrine cells. En: DELELLIS RA, ed. *Diagnostic immunohistochemistry*. New York. Masson Publishing USA. Inc. 1981: 111-135.
- 12.— GERSELL DJ, GREEDER MH, GIGERICH RL. Cellular localization of PP in the human and canine pancreas. *Diabetes* 1979; 25: (Suppl. 1) 364.
- 13.— BARBEZAT G, GROSSMAN MI. Intestinal secretion: stimulation by peptides. *Science* 1971; 174: 422-424.
- 14.— PAULIN C, DUBOIS PM. Immunohistochemical identification and localization of pancreatic polypeptide cells in the pancreas and gastrointestinal tract of the human fetus and adult man. *Cell Tiss Res* 1978; 188: 251-257.
- 15.— BUFFA R, CAPELLA C, FONTANA L et al. Types of endocrine cells in human colon and rectum. *Cell Tiss Res* 1978; 192: 227-240.
- 16.— STERNBERGER LA, HARDY PH Jr et al. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18:315.
- 17.— ESCOVAR G, HANSSSEN H, URIBE G. Estudio inmunocitoquímico de las hormonas de la adenohipofisis humana. I. Hormona del crecimiento. *Acta Med Col* 1981; 3: 257-270.
- 18.— BAKER BI, MIDGLEY AR et al. Differentiation of growth hormone and prolactin containing acidophils with peroxidase labeled antibody. *Anat Rec* 1969; 164: 163-172.
- 19.— BOHN W. A fixation method for improved antibody penetration in electron microscopical immunoperoxidase studies. *J Histochem Cytochem* 1978; 26: 293-297.
- 20.— GLAUERT AM. The fixation and embedding of biological specimens. En: KAY DH. ed. *Techniques for electron microscopy*. 2nd ed. Philadelphia: F.A. Davis Co., 1965: 166.
- 21.— NEWCOMB EH. Data Sheet 1970; N° 128. Warrington: Polysciences Inc.
- 22.— BORDI C, TOGNI D, BAETENS M et al. Human islet cell tumor storing pancreatic polypeptide: a light and electron microscopic study. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 46: 215-219.
- 23.— LARSON LI, SCHWARTZ T, LUNDQVIST G et al. Occurrence of human pancreatic polypeptide in pancreatic endocrine tumors. *Am J Path* 1976; 85: 675-682.
- 24.— SCHWART TW. Pancreatic polypeptide (PP) and endocrine tumors of the pancreas. *Scand J Gastroenterol* 1979; 14 (Suppl. 53): 93-100.
- 25.— SEEMAN P. Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membranes after lysis by saponin and lysolecithin. *J Cell Biol* 1967; 32: 55.
- 26.— CLAYTON F, SIBLEY RK, ORDOÑEZ NG, HANSSSEN G. Argyrophilic breast carcinomas. Evidence of lactational differentiation. *Am J Surg Path*. En prensa.
- 27.— FORSSMANN WG, HELMSTAEDTER V, METZ J, GREENBERG J et al. The identification of the F cell in the dog pancreas as the pancreatic polypeptide producing cell. *Histochem* 1977; 50: 281-290.
- 28.— SOLCIA E, CAPELLA C, BUFFA R, FRIGERIO B et al. Endocrine cells of the gastrointestinal tract and related tumors. En: IOACHIM HL, ed. *Pathobiology annual*. New York. Raven Press 1979;9:163-204.
- 29.— CAPELLA C, SOLCIA E, FRIGERIO B et al. The endocrine cells of the pancreas and related tumors. Ultrastructural study and classification. *Virchows Arch Pathol Anat Histol* 1977; 373: 327-352.
- 30.— GREENBERG GR, ADRIAN TE, BARON JH et al. Inhibition of pancreas and gallbladder by pancreatic polypeptide. *Lancet* 1978; 2: 1280.
- 31.— FLOYD JC Jr, CHANCE RE, HAYASI M et al. Concentration of a newly recognized pancreatic polypeptide in plasma of healthy subjects and in plasma and tumors of patients with insulin-secreting islet cell tumors. *Clin Res* 1975; 23: Abstr. 535.
- 32.— TRACK NS, WATTERS LM, GAULDIE J. Motilin and human pancreatic polypeptide (HPP) plasma concentrations. *Scand J Gastroenterol* 1978; 13 (Suppl. 49): Abstr. 187.
- 33.— FLOYD JC, FAJANS SS, PEK S, CHANCE RE. A newly recognized pancreatic polypeptide, plasma levels in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 1977; 33: 519.
- 34.— IVERSON J, BLOOM SR, ADRIAN TE, HERMANSEN K. Control of glucagon, insulin and pancreatic polypeptide secretion in the isolated pancreas. *Acta Endocrinol* 1978; 212 (Suppl.): 8.
- 35.— GEPTS W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 1965; 14: 619.
- 36.— BAETENS D, STEFAN Y, RAVAZZOLA M et al. Alteration of islet cell populations in spontaneously diabetic mice. *Diabetes* 1978; 27: 1-7.
- 37.— FRIESEN SR, KIMMEL JR, TOMITA T. Pancreatic polypeptide as screening marker for pancreatic polypeptide apudomas in multiple endocrinopathies. 1980; 139: 61-72.
- 38.— POLAK JM, BLOOM SR, ADRIAN TE, HEITZ PL et al. Pancreatic polypeptide in insulinomas, gastrinomas, vipomas and glucagonomas. *Lancet* 1976; 1: 328-330.
- 39.— ADRIAN TE, BLOOM SR, BESTERMANN HS et al. Pancreatic polypeptide in adenocarcinomas and apudomas including the carcinoid syndrome. *Scand J Gastroenterol* 1978; 13 (Suppl. 49): 2 (Abstr. 2).
- 40.— LUNDQVIST G, KRAUSE U, LARSON LI et al. A pancreatic polypeptide producing tumour associated with the WHDA syndrome *Scand J Gastroenterol* 1978; 13: 715-718.