

VII REUNIÓN DE LA AGRUPACIÓN NACIONAL PARA EL ESTUDIO DEL PÁNCREAS (ANEP)

Sesión 1/Fisiología y pancreatitis aguda experimental

MECANISMOS DE ACUMULACIÓN DE HCO_3^- A TRAVÉS DE LA MEMBRANA BASOLATERAL EN CONDUCTOS PANCREÁTICOS DE RATÓN

P. Fernández-Salazar, P. Pascua, J.I. San Román, M.A. López, J.J. Calvo, R.M. Case* y M.C. Steward*

Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca, España y *School of Biological Sciences, University of Manchester, U.K.

Introducción: Los mecanismos de secreción de electrolitos en conductos pancreáticos de ratón son poco conocidos. El punto de vista general es que, como sucede en la rata, el HCO_3^- se acumula a través de la membrana basolateral mediante la actividad de un intercambiador Na^+/H^+ (NHE) y un cotransportador $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ (NBC). Existe también una secreción importante de Cl^- a través de un cotransportador $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ sensible a bumetanida. Sin embargo, nosotros hemos demostrado que, en conductos pancreáticos de ratón, la secreción de fluido está sólo parcialmente bloqueada cuando se utiliza una combinación de amilorida, DIDS y bumetanida.

Objetivo: El propósito de este trabajo era investigar los mecanismos responsables de esta secreción residual.

Material y métodos: Se aislaron conductos pancreáticos de ratón por procedimientos previamente descritos. El pH intracelular se midió por técnicas de microfluorimetría utilizando conductos cargados con BCECF. La secreción al interior del espacio luminal se determinó usando técnicas de videomicroscopía digital.

Resultados: La recuperación del pH en presencia de HCO_3^- extracelular después de una carga ácida con NH_4Cl se bloqueó parcialmente con amilorida 0,3 mM (73% de inhibición) o por una mezcla de amilorida + DIDS 0,5 mM (72% de inhibición). Un bloqueante del NHE distinto, el EIPA (3 #mM), inhibía en un 78% la recuperación del pH. La recuperación del pH insensible a los bloqueantes dependía de la presencia de HCO_3^- y Na^+ en el medio extracelular, lo que sugería la intervención del cotransportador NBC. Para probar la hipótesis de la existencia de un cotransportador NBC insensible al bloqueo por DIDS, combinamos EIPA + H_2DIDS (0,5 mM) obteniendo una inhibición mayor, del orden del 83%. En presencia de bumetanida (30 #mM) en el medio de perfusión, amilorida o EIPA inhibían parcialmente (67% y 65%, respectivamente) la secreción de fluido en conductos aislados de ratón. Sin embargo, la combinación de EIPA + H_2DIDS bloqueaba completamente la secreción de fluido, desde 382 ± 32 en su ausencia hasta $0,6 \pm 10 \text{ pl min}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ en su presencia.

Conclusión: En conductos pancreáticos de ratón el HCO_3^- se acumula a través de la membrana basolateral por la actividad simultánea del intercambiador NHE y el cotransportador NBC. El NBC pancreático de ratón es insensible al DIDS, pero puede ser bloqueado por H_2DIDS .

EFFECTO DE AGONISTAS ADRENÉRGICOS EN LA SECRECIÓN DE FLUIDO DE CONDUCTOS PANCREÁTICOS AISLADOS DE RATÓN

P. Pascua, P. Fernández-Salazar, J.I. San Román, M.A. López y J.J. Calvo

Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca.

Introducción: Existen resultados controvertidos en relación a la influencia del sistema nervioso simpático sobre el control de la secreción de agua y electrolitos por el páncreas. Algunos estudios *in vivo* han demostrado la existencia tanto de efectos estimulantes como inhibidores. Utilizando técnicas de *patch-clamp*, Novak (*Gastroenterol* 1998; 115: 714-21) demostró que la estimulación β -adrenérgica regula la actividad de canales iónicos de conductos pancreáticos de rata.

Objetivo: El propósito de este trabajo era investigar los efectos de algunos agonistas adrenérgicos sobre la secreción de fluido en conductos pancreáticos aislados de ratón.

Material y métodos: Se aislaron conductos pancreáticos de ratón utilizando métodos previamente descritos. La secreción de fluido hacia el espacio luminal se determinó mediante técnicas de videomicroscopía digital.

Resultados: En presencia de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ en el fluido extracelular, isoproterenol (1 μM), un agonista β -adrenérgico, estimuló la secreción de fluido de forma significativa, desde $6 \pm 8 \text{ pl min}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ en conductos no estimulados hasta $129 \pm 19 \text{ pl min}^{-1} \text{ mm}^{-2}$. Este efecto estimulante no se reprodujo con fenilefrina (1 μM), un agonista α -adrenérgico ($14 \pm 9 \text{ pl min}^{-1} \text{ mm}^{-2}$). Además, el efecto estimulante del isoproterenol se bloqueaba completamente en presencia de propranolol 1 μM , un bloqueante β -adrenérgico específico ($18 \pm 6 \text{ pl min}^{-1} \text{ mm}^{-2}$), mientras que la presencia de fentolamina 1 μM , un bloqueante α -adrenérgico, no afectó a la estimulación de la secreción por propranolol ($135 \pm 26 \text{ pl min}^{-1} \text{ mm}^{-2}$).

Conclusión: Estos resultados demuestran que los agonistas β -adrenérgicos (pero no los α adrenérgicos) estimulan la secreción de fluido en conductos pancreáticos aislados de ratón.

PROTEÍNA-2 ASOCIADA CON LA MEMBRANA DE LOS LISOSOMAS (LAMP-2) EN PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL

P. Juanes*, N. Pérez-González*, J.J. Calvo** y C. Sánchez-Bernal*

Departamentos de bioquímica y Biología Molecular y **Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca. Salamanca.

Introducción: Los lisosomas son orgánulos celulares que se han relacionado con la fisiopatología de la pancreatitis aguda (PA). Un componente mayoritario de la membrana lisosómica de muchas células es una proteína altamente glicosilada, denominada proteína-2 asociada a la membrana de los lisosomas (LAMP-2).

Objetivo: El propósito del presente trabajo ha sido determinar si la presencia de la LAMP-2 pancreática estaba modificada en la pancreatitis aguda.

Material y métodos: PA fue inducida en ratas mediante cuatro inyecciones subcutáneas (20 #mg/Kg, a intervalos de 1 hora) de ceruleína. Después de 9 h de la primera inyección, se obtuvieron los páncreas, se homogeneizaron y se sometieron a un fraccionamiento subcelular. Una fracción enriquecida en lisosomas y mitocondrias (L+M) se aplicó a un gradiente discontinuo de Percoll, mediante el cual se separaron tres fracciones de lisosomas de diferente densidad. En estas fracciones se evaluó la presencia de LAMP-2 mediante SDS-PAGE seguida de Western-blot, utilizando un anticuerpo policlonal anti-LAMP-2 y revelado con quimioluminiscencia. Se realizaron comparaciones entre muestras pancreáticas y controles (obtenidas de ratas tratadas con suero fisiológico).

Resultados: LAMP-2 se detectó en las tres fracciones lisosómicas aisladas. En ratas control, se encontraron cinco bandas de 96, 89, 64, 55 y 48 KDa, siendo la proteína de 96 KDa la mayoritaria. Después de la inducción de la PA se observaron disminuciones significativas, en las tres fracciones de lisosomas, en la banda de 96 KDa (64%, 72% y 77% de disminución, respecto a las controles) y en la banda de 64 KDa. La proteína de 89 KDa no se detectó en las muestras pancreáticas. Sin embargo, en estas muestras se obtuvieron incrementos significativos en las bandas de 48 y 55 KDa en las tres fracciones lisosómicas.

Conclusión: Los lisosomas pancreáticos contienen varias proteínas que reaccionan con un anticuerpo policlonal anti-LAMP-2. En la pancreatitis aguda se observaron disminuciones significativas en las proteínas de 96, 89 y 64 KDa, mientras que en las proteínas de bajo peso molecular se detectaron incrementos significativos en comparación con las controles.

INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL TNF- α Y DE LA XANTINA OXIDASA EN LA PANCREATITIS AGUDA: EFECTOS SOBRE EL PULMÓN

J. Pereda, L. Sabater, N. Cassinello, L. Gómez-Cambronero, D. Closa, E. Folch, L. Aparisi, M. Cerdá, J. Calvete, F. Pallardó, B. Camps, S. Lledó, J. Viña y J. Sastre

Dpto. Fisiología, Dpto. Anatomía Patológica, Universitat de Valencia. Servicio de Cirugía General y Digestiva, Servicio de Digestivo, Hospital Clínico Universitario. Dpto. de Bioanalítica Médica. IIBB, CSIC, Barcelona.

Introducción: El fallo pulmonar es la causa más frecuente de muerte precoz en la pancreatitis aguda severa (PAS). Este efecto sistémico se ha relacionado con la activación de al menos dos vías de la inflamación: citoquinas y estrés oxidativo.

Objetivo: Investigar los efectos que se consiguen a nivel pulmonar al inhibir simultáneamente la producción de TNF- α y la actividad xantina oxidasa en la PAS.

Material y métodos: La PAS se indujo en ratas Wistar macho mediante la infusión intraductal de taurocolato-sódico al 3,5%. Como inhibidor de la actividad xantina oxidasa se ha utilizado oxipurinol y como inhibidor de la producción de TNF- α , pentoxifilina. Se han determinado los niveles de TNF- α y lipasa en suero, la actividad xantina oxidasa en plasma, la actividad mieloperoxidasa (MPO) y los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) en tejido pulmonar. Además, se ha realizado el correspondiente estudio histológico del pulmón y un estudio de supervivencia en ratas con PAS sin tratamiento (n = 30) y con tratamiento combinado (n = 30).

Resultados: La administración de pentoxifilina u oxipurinol por separado no evitan el aumento de la MPO pulmonar tras la inducción de la PAS. Sin embargo el tratamiento combinado consigue prevenir significativamente dicho aumento. La pentoxifilina y el tratamiento combinado previnieron la depleción moderada de GSH en pulmón, mientras que el oxipurinol no modificó significativamente los niveles de GSH. En cambio, el oxipurinol y el tratamiento combinado lograron prevenir el aumento de GSSG. También el tratamiento combinado consiguió reducir de forma significativa la acti-

vidad lipasa en suero tras inducir la PAS. El examen histológico del pulmón reveló una marcada reducción del infiltrado inflamatorio cuando se administraban conjuntamente el oxipurinol y la pentoxifilina. Finalmente, la tasa de mortalidad del grupo con tratamiento combinado (3,3%) fue significativamente inferior que en el grupo de PA sin tratamiento (20%).

Conclusiones: El tratamiento combinado con pentoxifilina y oxipurinol reduce el proceso inflamatorio pulmonar asociado a la PAS. La inhibición simultánea de la producción de TNF- α y la actividad xantina oxidasa atenúa la interacción entre el estrés oxidativo y las citoquinas proinflamatorias que amplifica la respuesta inflamatoria.

LA HEPARINA AUMENTA LA INFLAMACIÓN PULMONAR EN LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL MEDIANTE LA MOVILIZACIÓN DE XANTINA OXIDASA

S. Granell y D. Closa

Dpt. of Medical Bioanalysis. IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona.

Introducción: En la pancreatitis, la xantina oxidasa circulante (XOD) constituye un sistema generador de radicales libres que está implicado en el proceso inflamatorio pulmonar asociado. Se ha descrito que XOD puede unirse a la pared externa de las células endoteliales y que la heparina puede interferir en esta unión. Por lo tanto, se puede sospechar que la administración de heparina puede modificar la distribución de la XOD circulante en la pancreatitis aguda y este hecho puede resultar de interés en la modulación de la inflamación pulmonar asociada a la pancreatitis.

Objetivo: Evaluar el efecto de la heparina de bajo peso molecular en la concentración plasmática de xantina oxidasa durante la pancreatitis aguda y su efecto en el desarrollo del proceso inflamatorio pulmonar.

Métodos: La pancreatitis aguda fue inducida en ratas Wistar macho por administración intraductal de taurocolato sódico al 5%. La heparina de bajo peso molecular (0, 30, 90 or 300 U/kg) fue administrada inmediatamente después de la inducción de la pancreatitis. Tres horas después de la inducción, se midieron las concentraciones plasmáticas de lipasa y xantina oxidasa. Se midió la actividad mieloperoxidasa en hígado y pulmón como marcador de la infiltración de neutrófilos. También se determinó la expresión de la P-selectina en pulmón.

Resultados: Durante la pancreatitis tiene lugar un incremento en la concentración plasmática de xantina oxidasa. La administración de heparina también induce un incremento adicional en la concentración de xantina oxidasa, tanto en animales controles como con pancreatitis. La infiltración de neutrófilos en pulmón se incrementó durante la pancreatitis y la heparina indujo aumentos adicionales de manera dosis-dependiente. En los animales controles, la heparina no tuvo ningún efecto sobre los niveles de mieloperoxidasa en pulmón. Asimismo, en hígado no se observaron cambios como consecuencia de la pancreatitis ni de la administración de heparina. Finalmente, la expresión de P-selectina aumentó en pulmón durante la pancreatitis y este aumento fue mayor tras el tratamiento con heparina. En cambio, en los animales controles, la heparina no tuvo efectos sobre la expresión de P-selectina.

Conclusión: Durante la pancreatitis aguda la administración de heparina puede movilizar la xantina oxidasa unida a las células endoteliales y generar un sistema productor de radicales libres de oxígeno que puede disparar la reacción inflamatoria en pulmón.

INFLUENCIA DE LA SANGRE PORTAL Y MESENTÉRICA EN LA INDUCCIÓN DE LA LESIÓN PULMONAR EN LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL

S. Granell, N. Heredia, L. Fernández-Cruz y D. Closa

Dpto. de Bioanalítica Médica. IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona. Dpto. de Cirugía, Hospital Clínic, Barcelona.

Introducción: Trabajos previos de nuestro grupo han indicado que, durante la pancreatitis, el proceso inflamatorio en el pulmón puede ser modulado por una derivación porto-sistémica. Ello sugiere que

la lesión pulmonar está relacionada con el paso a través del hígado de mediadores liberados por el páncreas inflamado. La derivación porto-sistémica evita el paso a través del hígado tanto de sangre pancreática como intestinal y no permite discriminar si los mediadores derivados del intestino también juegan un papel en el desarrollo de la lesión pulmonar asociada a la pancreatitis.

Objetivo: Evaluar la influencia de la sangre portal y mesentérica en la inducción de la lesión pulmonar en un modelo de pancreatitis aguda experimental

Métodos: La pancreatitis aguda se indujo en ratas macho de la cepa Wistar por administración intraductal de taurocolato sódico 5%. En algunos animales se realizó una derivación porto-cava o meso-cava de la sangre inmediatamente antes de la inducción de la pancreatitis. Tres horas después de la inducción se obtuvieron muestras de plasma, pulmón, hígado e intestino. Se determinaron los niveles de lipasa I receptores solubles de TNF α en plasma. La actividad mieloperoxidasa se determinó como indicador del reclutamiento de neutrófilos. La expresión del mRNA de iNOS, TNF α , IL-1 β , MIP-2 y hsp-72 se evaluó en muestras de tejido.

Resultados: Tras la inducción de la pancreatitis se detectó un aumento significativo en los niveles de actividad mieloperoxidasa en páncreas y pulmón. No se observaron cambios inflamatorios en el intestino. En plasma tanto la concentración de TNF como de sus receptores solubles aparecieron incrementados. La expresión de mediadores inflamatorios se indujo tanto en hígado como en pulmón. La derivación meso-cava no modificó ninguno de estos parámetros. En cambio, cuando se realizó una derivación porto-cava no se observaron aumentos en los niveles plasmáticos de TNF α y se evitó el incremento en la actividad mieloperoxidasa en pulmón. Además, la expresión de TNF, IL-1B y Hsp-72 en pulmón se evitó, mientras que la de MIP-2 e iNOS no fue modificada. La derivación porto-cava no modificó los incrementos en las concentraciones plasmáticas de los receptores solubles del TNF α .

Conclusión: Durante la pancreatitis aguda, el paso de la sangre portal a través del hígado induce la síntesis y liberación de TNF α que, a su vez, está implicado en la inducción del proceso inflamatorio en el pulmón. La sangre mesentérica no parece desempeñar un papel importante en este proceso.