

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

**CONTRIBUCIÓN DE LAS VIAS NITRÉRGICAS EN LA
REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN PANCREÁTICA Y EN LA
PATOGENIA DE LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL.**

Tesis presentada por
Eva Cristina Vaquero Raya,
para optar al grado de Doctor
en Medicina y Cirugía.

Barcelona, septiembre de 1998.

Joan Ramon MALAGELADA BENAPRÉS, Professor Titular del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona,

FA CONSTAR,

Que la Tesi Doctoral titulada **CONTRIBUCIÓN DE LAS VÍAS NITRÉRGICAS EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN PANCREÁTICA Y EN LA PATOGENIA DE LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL**, realitzada per la Llicenciada **Eva Cristina VAQUERO RAYA**, dirigida per mi, per a optar al grau de Doctor, representa una gran aportació al tema i reuneix mèrits suficients per ser presentada i defensada davant del Tribunal corresponent.

I perquè així consti, signo la present a Barcelona, a trenta-ú de juliol de mil nou-cents noranta-vuit.



Departament de Medicina

Dr. J.R. MALAGELADA BENEPRÉS
Director de la Tesis Doctoral



Vall d'Hebron
Hospitals

Pg. Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona
Tel. (93) 489 30 00 i 274 60 00
Fax (93) 489 44 38

Xavier MOLERO RICHARD, Metge Adjunt del Servei de Digestiu de l'Hospital General Universitari de la Vall d'Hebron i Doctor en Medicina i Cirurgia,

FA CONSTAR,

Que la Tesi Doctoral titulada **CONTRIBUCIÓN DE LAS VÍAS NITRÉRGICAS EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN PANCREÁTICA Y EN LA PATOGENIA DE LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL**, presentada per Na **Eva Cristina VAQUERO RAYA**, i dirigida per mi per a optar al grau de Doctor, representa una gran aportació al tema i reuneix mèrits suficients per ser presentada i defensada davant del Tribunal corresponent.

I perquè així consti, signo la present a Barcelona, trenta-ú de mil nou-cents noranta-vuit.

Dr. X. Molero Richard



L PARTE TEORICA

A. EL OXIDO NITRICO

1. ASPECTOS GENERALES

2. BIOSÍNTESIS DEL NO (NOS)

2.1 Sintasa del NO

2.1.2 ISOENZIMAS DE LA NOS

2.1.3 ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

3 REGULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD DEL NO

4. MECANISMOS DE ACCIÓN CELULAR DEL NO

4.1 NO de origen neural

4.2 NO de origen endotelial

4.3 NO de origen inducible

5. MOLÉCULAS DIANA DEL NO

5.1 Reacción con metales de transición

5.2 Reacción con grupos tiol

5.3 Reacción con el anión superóxido

6. EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL NO

5.1 NO de origen endotelial

5.2 NO de origen neural

B. MECANISMOS DE CONTROL DE LA SECRECIÓN ENZIMÁTICA DEL PÁNCREAS

1. INTRODUCCIÓN

2. LA CÉLULA ACINAR

3. SEÑALES INTRACELULARES

4. SEÑALES EXTRACELULARES.

4.1 Control hormonal. CCK

4.2 Control neural

5. ANATOMÍA FUNCIONAL DE LA INERVACIÓN PANCREÁTICA.

5.1 Fibras parasimpáticas y simpáticas

5.2 Fibras capsálicas

5.3 Inervación enteropancreática

5.4 Fibras nitrérgicas

II. PARTE EXPERIMENTAL

1. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1.1 HIPÓTESIS

1.2 OBJETIVOS DE LOS ESTUDIOS

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 MATERIALES

2.2 ANIMALES

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 Análisis de la secreción exocrina pancreática *in vivo*

2.3.2 Medición de la tensión arterial

2.3.3 Inducción de pancreatitis aguda

2.3.3.1 PANCREATITIS EDEMATOSA

2.3.3.2 PANCREATITIS NECROHEMORRÁGICA

2.3.4 Medición de los parámetros de gravedad de la lesión pancreática

2.3.4.1 EXAMEN HISTOLÓGICO

2.3.4.2 ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE AMILASAS

2.3.4.3 CUANTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA TISULAR

2.3.4.4 MEDICIÓN DE PÉPTIDOS DE ACTIVACIÓN DEL TRIPSINÓGENO..

2.3.5 Medición de nitritos/nitratos en sangre

2.3.6 Estudios inmunohistoquímicos en tejido pancreático.

2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.4.1 Estudio de la modulación nitrérgica en la secreción pancreática

2.4.1.1 INHIBICIÓN DE LA NOS TOTAL

2.4.1.2 INHIBICIÓN DE LA NOS NEURAL

2.4.1.3 ABLACIÓN SENSORIAL DE FIBRAS NEURALES AFERENTES...

2.4.1.4 INHIBICIÓN DE LA NOS INDUCIBLE

2.4.1.5 SUSTRACCIÓN DEL NO CIRCULANTE

2.4.2 Estudio de la inhibición de la NOS neural en la pancreatitis aguda edematosa

2.4.3 Estudio de la implicación del óxido nítrico en la pancreatitis aguda

2.4.3.1 RELACION DEL NO CON LA GRAVEDAD DE LA PANCREATITIS AGUDA

2.4.3.2 CONSECUENCIAS DE LA INHIBICIÓN DE LA NOS INDUCIBLE

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

3. RESULTADOS

3.1 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL NO SOBRE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA

3.1.1 Patrón Normal de Secreción. Estimulación con ceruleína

3.1.2 Inhibición del NO

3.1.2.1 EFECTOS SOBRE LA TENSIÓN ARTERIAL

3.1.2.2 EFECTOS SOBRE LA SECRECIÓN NO ESTIMULADA

3.1.2.3 EFECTOS SOBRE LA SECRECIÓN ESTIMULADA

3.2 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA NOS NEURAL SOBRE LA PANCREATITIS AGUDA INDUCIDA POR CERULEÍNA

3.3 IMPLICACIÓN DEL NO EN LA PANCREATITIS AGUDA

3.3.1 Relación de la formación de peroxinitritos con la gravedad de la pancreatitis aguda

3.3.2 Consecuencias de la inhibición de la NOS inducible

III. DISCUSIÓN

IV. CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS

V. BIBLIOGRAFÍA

L PARTE TEORICA

A. OXIDO NITRICO

1. ASPECTOS GENERALES

El óxido nítrico es una molécula inorgánica de pequeño tamaño y simple estructura química ($\text{N}=\text{O}$, abreviado $\text{NO}^{\bullet}$), cuyo electrón libre le confiere naturaleza de radical. El NO reacciona rápidamente con otras especies poseedoras también de un número impar de electrones, como son el oxígeno, el anión superóxido y metales de transición. Esta pequeña molécula liposoluble posee una alta capacidad de difusión que le permite fácilmente atravesar las membranas celulares eludiendo cualquier mecanismo de liberación o captación de moléculas que pudiera controlar su actividad [Lancaster, 1994; Wood, 1994]. Sin embargo, su breve vida media en un sistema biológico (de 3 a 30 segundos) limita su área de actuación a la vecindad de su origen. Una vez sintetizado, el NO difunde a células adyacentes donde activa la guanilato ciclasa, que transforma el GTP en GMP cíclico (GMPc), el cual media la mayoría, aunque no todas, las acciones biológicas del NO.

Este radical es sintetizado en una gran variedad de células en el organismo de los mamíferos, donde constituye un importante mensajero intra e intercelular en diversas funciones biológicas, como son la vasodilatación, neurotransmisión y defensa inmunológica. No obstante, el NO no cumple la definición clásica de mensajero intercelular, por cuanto no es secretado por un sistema de transporte ni posee un receptor de membrana al cual unirse. Es su naturaleza de radical, su capacidad de difusión libre y las características químicas del entorno biológico que le rodea los determinantes de sus variados efectos.

2. BIOSÍNTESIS DEL NO

2.1 Sintasa del NO (NOS)

2.1.1 ISOENZIMAS DE LA NOS

Existen tres isoenzimas diferentes de la NOS que aunque comparten la misma actividad catalítica difieren en su estructura, localización cromosómica y regulación de su actividad [Griffith, 1995; Knowles, 1994]. La **NOS neural** (nNOS, NOS I) y la **NOS endotelial** (eNOS, NOS III) se reconocen como isoenzimas constitutivas de la NOS (cNOS), y se localizan principalmente (aunque no exclusivamente) en el sistema nervioso central y periférico y en el endotelio vascular, respectivamente. Esta categoría de la NOS se caracteriza por hallarse expresada de forma continuada en condiciones basales y por ser su activación enzimática dependiente de los incrementos de Ca^{2+} libre intracelular y de la calmodulina [Bredt, 1989]. Una vez activada, la cNOS produce cantidades picomolares de NO que como mensajero intercelular intervendrá en el control de diversas funciones biológicas (homeostasis, neurotransmisión, etc). El tercer isoenzima es la **NOS inducible** (iNOS, NOS II), el cual no se halla expresado en condiciones normales sino que se sintetiza *de novo* en diversas células (macrófagos, leucocitos, hepatocitos, células musculares, condrocitos) [Nussler, 1993] tras recibir un estímulo inflamatorio o inmunológico apropiado (endotoxina bacteriana, interleukinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral, etc) y de forma independiente a la concentración de Ca^{2+} intracelular. Una vez inducida, la iNOS puede permanecer activa durante varios días [Nathan, 1994] dando lugar a concentraciones nanomolares de NO, 100 veces superiores a las generadas por la cNOS, que comportan efectos citostáticos o citotóxicos contra células tumorales y microorganismos invasores críticos en la defensa del organismo.

2.1.3 ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El NO es sintetizado a partir de uno de los dos nitrógenos del grupo guanidino

terminal de la L-arginina en un proceso catalizado enzimáticamente por la sintasa del óxido nítrico (NOS) [Palmer, 1988]. El hecho de no utilizar ATP en la reacción hace inapropiado el término sintetasa para denominar a este enzima. La formación de NO se inicia con la hidroxilación de la L-arginina en L-N^G hidroxarginina, un metabolito intermedio de la reacción [Stuehr, 1991], que mediante la incorporación de un segundo átomo de oxígeno da lugar a una molécula de NO y una de citrulina [Moncada, 1989]. En este proceso, el homodímero activo de la NOS (la forma monomérica no es activa) utiliza NADPH, O₂ y arginina como cosubstratos y dos flavinas (FAD y FMN), un grupo heme (protoporfirina IX) y tetrahidrobiopterina como cofactores. La calmodulina es otro cofactor esencial de la NOS, con la particularidad de que su unión a la NOS constitutiva es reversible y promovida por incrementos en la concentración de Ca²⁺ intracelular en el proceso de activación enzimática [Marletta, 1993]. Por el contrario, la calmodulina mantiene un fuerte enlace con la isoenzima inducible de la NOS independientemente de las variaciones de Ca²⁺ intracelular [Cho, 1992].

3. REGULACION FARMACOLOGICA DE LA ACTIVIDAD DEL NO

Hasta el momento, son múltiples las sustancias desarrolladas con las cuales manipular la actividad biológica del NO. La principal vía para ello es interfiriendo en su síntesis, efecto que puede tener lugar a diferentes niveles del proceso enzimático [Moore, 1997]. Estos puntos de interacción incluyen la inhibición de captación de L-arginina al interior celular, reducción de la disponibilidad intracelular de cofactores de la NOS (NADPH, FAD, FMN, calmodulina, Ca²⁺, tetrahidrobiopterina) o unión al grupo prostético heme de la NOS. Una vez completada la síntesis, la propia molécula de NO puede ser el objetivo de acción, como es el caso de la hemoglobina, cuyo grupo heme capta e inactiva el NO libre circulante. Todas estas acciones se traducen en una disminución de la actividad del NO, bien sea por una menor producción o bien por destrucción de la propia molécula.

Sin embargo, también se dispone de sustancias que pueden inferir positivamente en la síntesis de NO, como es la inducción de la actividad iNOS mediante endotoxina bacteriana, citokinas o interferón gamma, o la estimulación de la nNOS o eNOS por parte de los estrógenos.

De la gran variedad de inhibidores de la NOS de que disponemos, cada uno de ellos se caracteriza por unas propiedades específicas (estructura química, mecanismo de acción, grado de especificidad isoenzimática, efectos colaterales) que delimitan su uso según el efecto que se quiera conseguir. Estos inhibidores han sido ampliamente utilizados en los últimos años con la finalidad de investigar la importancia fisiopatológica del NO.

La especificidad de actuación del inhibidor respecto a los enzimas de la NOS es una de las propiedades más interesantes de estas sustancias a la hora de investigar un efecto derivado del NO. En el caso de la inflamación y el shock, el NO derivado de la iNOS es el responsable de la mayor parte de efectos patológicos desencadenados, en tanto que la cNOS desarrolla una función protectora. En estas situaciones, la inhibición global de la NOS puede enmascarar el beneficio obtenido al inhibir la iNOS.

Según la estructura química, los inhibidores de la NOS se clasifican en dos categorías principales, que son 1) los análogos derivados de aminoácidos y 2) los no derivados de aminoácidos [Southan, 1996].

INHIBIDORES DERIVADOS DE AMINOACIDOS

Son varios los aminoácidos (arginina, ornitina, lisina, citrulina) que tras modificar su estructura química pueden actuar como inhibidores de la NOS (ej: L-iminoetil-ornitina, L-tiocitrulina, L-N⁶-(1-iminoetil)lisina). Sin embargo, son los **análogos de la L-arginina** los de uso más extendido y sobre los cuales se tiene mayor conocimiento. La acción inhibidora que los derivados de aminoácidos ejercen sobre la NOS ha sido ampliamente demostrada tanto *in vitro* como en una

variada selección de células aisladas, tejidos biológicos y animales *in vivo* [Griffiths, 1996].

Los inhibidores derivados de la arginina resultan de la substitución de uno o ambos nitrógenos guanidino terminales del citado aminoácido, dando origen a conocidos compuestos, como son L-MMA (monometil-L-arginina), L-NA (N^G -nitro-L-arginina), L-NAME (N^G -nitro-L-arginin metil ester) y L-NMA (N^G -metil-L-arginina). La forma isomérica L constituye por lo general el inhibidor activo de la NOS, en tanto que el isómero D no presenta actividad inhibidora, salvo en alguna excepción, como es el caso del L-NA y D-NA, ambas formas inhibidoras de la NOS endotelial [Wang, 1993].

La inhibición que estos compuestos provocan sobre la actividad NOS radica en la ocupación enzimática del sitio de específico de unión de la L-arginina, que es el sustrato esencial para la formación de NO. Esta unión es competitiva, de manera que la inhibición producida por estos compuestos es, salvo excepciones, un efecto total o parcialmente reversible al proporcionar L-arginina a la preparación o sistema. A pesar de esta acción común, el mecanismo preciso de acción varía según el análogo y la isoenzima inhibida.

Otra característica común de los análogos de la L-arginina es su pobre selectividad isoenzimática. Aunque estos compuestos suelen tener cierta preferencia isoenzimática, mayormente sobre la NOS endotelial, su administración ocasiona un amplio espectro de efectos farmacológicos derivados de la inhibición de las tres isoenzimas.

INHIBIDORES NO DERIVADOS DE AMINOACIDOS

Este grupo farmacológico incluye una larga lista de compuestos, como son los imidazoles, indazol y sus derivados nitroindazoles, guanidinas, iminobiotinas, isotioureas, taninas, fenciclidina, azul de metileno, entre otros [Southan, 1996]. Un aspecto interesante que ofrecen algunos de estos inhibidores es la selectividad

isoenzimática de su acción.

El **indazol** y su derivado **7-nitroindazol** son inhibidores selectivos de la sobre la NOS neural. Aunque el 7-nitroindazol *in vitro* se comporta como inhibidor equipotencial de la actividad eNOS y nNOS [Moore, 1993; Wolff, 1993], *in vivo* se ha demostrado que no inhibe la relajación endotelio-dependiente en anillos de aorta aislados y que carece de efecto sobre la tensión arterial en diferentes especies animales [Moore, 1993; Beierwaltes, 1995].

El mecanismo inhibitor del indazol y derivados consiste en su unión al grupo prostético heme de la NOS, interfiriendo así en la transferencia de electrones necesaria para la síntesis de NO.

Se han descrito diferentes efectos farmacológicos del indazol asociados a la inhibición selectiva sobre la nNOS, como es su efecto antinociceptivo antinocioceptivo [Moore, 1993]. En ratones, el indazol disminuye la reacción al dolor generad por la inyección plantar de formol y la contracción abdominal inducida por la inyección intraperitoneal de ácido acético.

En el grupo de las guanidinas destaca la **aminoguanidina** por su acción selectiva sobre la iNOS, su baja toxicidad de forma aguda y su potencial uso clínico. En comparación con L-NMA o L-NAME, la capacidad inhibidora de la aminoguanidina sobre la NOS presenta tanto *in vitro* como *in vivo* una potencia equivalente sobre la NOS inducible y una capacidad mucho menor sobre las isoenzimas endotelial y neural. En ratas anestesiadas, la potencia de la aminoguanidina sobre la inhibición de la NOS endotelial es del orden de 40 veces inferior a la de L-NAME, según cambios registrados en la presión arterial.

El NO generado por la forma inducible de la NOS se ha implicado en el desarrollo de numerosas condiciones patológicas, como son la sepsis, diabetes autoinmune, rechazo de órganos trasplantados, esclerosis múltiple, etc. De ahí el interés de un inhibidor selectivo de este isoenzima. La aminoguanidina se ha utilizado en diferentes modelos de inflamación y en situaciones de shock

consiguiendo efectos beneficiosos. Entre ellos destacan la inhibición de la progresión de la encefalitis autoinmune, inhibición de los efectos cardiovasculares derivados en la pancreatitis experimental y prevención de la extravasación pulmonar inducida por endotoxina, entre otros.

El mecanismo por el cual la aminoguanidina inhibe la NOS parece basarse en su unión al átomo de hierro del grupo heme situado en el centro catalítico del enzima, lo cual lleva a su desactivación.

4. MECANISMOS DE ACCIÓN CELULAR DEL NO

La mayoría de efectos biológicos derivados de NO son mediados por el enzima intracelular guanilato ciclasa [Hobbs, 1997]. La interacción entre el NO sintetizado en una célula tras recibir el estímulo apropiado y el grupo heme de la guanilato ciclasa citosólica situada en la célula diana representa el mecanismo de transferencia de señales que une el estímulo extracelular y la célula efectora.

Neurotransmisores, autacoides (acetilcolina, bradikinina, ...) y factores activos derivados de macrófagos y neutrófilos son los responsables de interaccionar selectivamente con el receptor extracelular adecuado promoviendo la activación de la NOS. El NO formado es considerado como un segundo mensajero. Este difunde al interior de la célula diana adyacente donde causa la activación heme-dependiente de la guanilato ciclasa, con la consiguiente formación de GMP cíclico. Este tercer mensajero ocasiona variados efectos, como son la relajación de la célula muscular lisa vascular, inhibición de la agregación y adhesión plaquetar y modulación de la función de macrófagos, neutrófilos y otras células fagocíticas. Este mecanismo de señalización intercelular o transcelular induce la activación de funciones celulares complementarias que se traducen en efectos tales como el aumento del flujo vascular, inhibición de la trombosis y modulación de la fagocitosis y citotoxicidad [Ignarro, 1990].

En este marco general de acción del NO existen algunas particularidades propias

del subtipo enzimático de origen.

4.1 NO de origen neural

El NO constituye un importante neurotransmisor central y periférico, aunque de características muy atípicas. Atendiendo a la definición clásica, un neurotransmisor es una sustancia química que se almacena en vesículas sinápticas de la terminación nerviosa, es liberada al espacio sináptico mediante fusión vesicular y se une a un receptor de membrana de la neurona adyacente. En contraste, el NO no es almacenado en vesículas, sino que su síntesis en la neurona se produce según la demanda metabólica. Rápidamente difunde libremente a través de la terminal nerviosa y en lugar de dirigirse hacia un receptor de membrana, el NO pasa al interior de células vecinas donde se une a una molécula diana intracelular, principalmente GMPc, produciendo su activación. Estas características definen la acción del NO en el sistema nervioso en parte como un neurotransmisor y en parte como una hormona.

Existen dos modelos básicos de actuación del NO a nivel neural [Garthwaite, 1991]. En las fibras nerviosas no adrenérgicas no colinérgicas, el NO se sintetiza como elemento presináptico en respuesta a un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Tras su síntesis, el NO difunde a la célula muscular lisa adyacente donde activará la guanilato ciclasa.

En el sistema nervioso central, la síntesis del NO tiene lugar en las neuronas postsinápticas como parte integrante de un sistema glutamatérgico. El circuito se inicia con el glutamato liberado por la terminal nerviosa presináptica, el cual se une, entre otros, al receptor postsináptico de membrana NMDA (*N*-metil-D-aspartato) produciendo su activación. Ello da lugar a la entrada de Ca^{2+} al interior de la neurona, que a través de la calmodulina estimula la actividad enzimática de la NOS constitutiva. El NO formado difundirá al exterior de la neurona hasta la guanilato ciclasa de estructuras adyacentes (fibras astrocitarias y terminales neurales presinápticas) donde producirá su acción.

4.2 NO de origen endotelial

Las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, especialmente las arterias, sintetizan NO en respuesta a la acetilcolina o la bradikina. Estos autacoides se unen a un receptor de membrana endotelial que provocará la entrada de calcio intracelular y consecuente activación enzimática de la NOS. La dilatación vascular dependiente del endotelio también es estimulada por el efecto de tensión que el flujo pulsátil y las turbulencias sanguíneas generan sobre estas células. El NO sintetizado difundirá a la célula muscular lisa del endotelio donde estimulará la guanilato ciclas dando lugar a la formación de GMPc. Esta molécula será la encargada final de inducir la relajación vascular y consiguiente vasodilatación.

4.3 NO de origen inducible

El NO formado por la NOS inducible basa parte de sus efectos en la gran cantidad en que es producido y en formación simultánea de otros radicales en condiciones de estrés. Por ejemplo, en el shock séptico la iNOS es estimulada por la endotoxina y por mediadores inflamatorios dando lugar a la producción masiva de NO que conducirá a una situación de hiporreactividad vascular. Por otra parte, el exceso de NO reaccionará con otros radicales libres, como el anión superóxido, dando lugar a la formación de un potente oxidante, que es el peroxinitrito. Esta molécula tiene la capacidad de inducir peroxidación de lípidos y nitración de proteínas. Su acción nitradora sobre los residuos de tirosina de las proteínas da lugar a la formación de nitrotirosina. Este aminoácido nitrado se ha utilizado como prueba del daño tisular derivado por la acción de los peroxinitritos en numerosas condiciones patológicas, como son la artritis reumatoide, la colitis ulcerosa, isquemia miocárdica, entre otras.

5. MOLÉCULAS DIANA DEL NO

En los sistemas biológicos en los que el NO se encuentra, este pequeño radical es capaz de desarrollar una variada gama de efectos fisiológicos o patológicos. La expresión funcional de tales efectos depende no de la propia naturaleza de la

molécula de NO, que es la misma donde quiera que se halle, sino de factores extrínsecos a ella. Uno de ellos es el **tipo de molécula diana** con la que interacciona, de tal modo que la acción del NO será diferente tras reaccionar con el grupo heme de la guanilato ciclasa (p. ej., vasodilatación) que con el grupo tiol de la albúmina (transporte del NO). Otro factor determinante es la **célula efectora** de su mensaje. Así, la enzima guanilato ciclasa tras ser activada por una molécula de NO emitirá diferentes mensajes en función del tipo de célula en que se ubique, de forma que situada en la neurona del córtex cerebral puede originar un efecto sobre la memoria, si se halla en la célula muscular lisa vascular inducirá la vasorrelajación y localizada en la plaqueta desarrollará un efecto antitrombótico.

Las moléculas diana del NO son muchas y variadas (enzimas, receptores, proteínas de señalización, canales iónicos, factores de transcripción), las cuales son susceptibles de ser activadas o inhibidas tras la reacción.

Tras ser sintetizado, el NO difunde desde su célula de origen a través de las membranas celulares y reacciona con el oxígeno (O_2), el anión superóxido (O_2^-) o con metales de transición, dando origen a los respectivos productos: NO_x (molécula de nitrógeno con diferentes niveles de oxidación), peroxinitrito ($ONOO^-$) y complejos metal-NO. Estos productos pueden comportarse como metabolitos intermedios responsables de reacciones de nitrosación de grupos tiol, cuyo producto son los llamados S-nitrosotioles [Stamler, 1994]. De hecho, los metales y grupos tiol constituyen las principales moléculas diana del NO. Ambos se halla situados estratégicamente en los centros alostéricos de diversas proteínas (receptores, factores de transcripción,...) que constituyen el complejo sistema de señalización del NO.

5.1 Rección con metales de transición

El grupo heme integrante en la estructura de diversas proteínas representa una importante molécula diana del NO. Entre estas heme proteínas encontramos la guanilato ciclasa, mioglobina, hemoglobina, catalasa, peroxidasa y citocromo c, de

las que comentaré algunas por su relevancia fisiológica e interés en este trabajo.

La enzima **guanilato ciclasa** constituye una de las moléculas cardinales en la actividad biológica del NO. Aunque cada vez se conoce mayor número de moléculas diana del NO, la mayoría de los efectos de este radical en condiciones fisiológicas están mediados por el receptor intracelular guanilato ciclasa [Garbers, 1992]. La unión del NO a un átomo de hierro situado en el grupo heme de la guanilato ciclasa origina un cambio de conformación tridimensional de la enzima que comporta su activación y consecuente síntesis de GTP cíclico a partir de GMP cíclico. Este segundo mensajero será el efector de la acción en la célula diana.

La **hemoglobina** es otra heme-proteína que se halla contenida en los hematíes y que se comporta, en parte, como molécula captadora e inactivadora del NO que circula libre en el torrente sanguíneo, limitando así la esfera de acción de este gas [Lancaster, 1994]. Este hecho se basa en la ávida reacción del NO con el hierro del grupo heme de la oxihemoglobina ($\text{Hb}[\text{Fe}_{\text{II}}]\text{O}_2$), dando origen a metahemoglobina y nitrato ($\text{Hb}[\text{Fe}_{\text{II}}]\text{O}_2 + \text{NO} > \text{Hb}[\text{Fe}_{\text{III}}] + \text{NO}_3^-$). De este modo, los glóbulos rojos crean un gradiente de difusión del NO hacia el interior del vaso sanguíneo que provee al organismo de una vía de drenaje para el NO sintetizado en exceso. La cantidad de NO generada por el endotelio puede ser de 10 a 40 veces superior a la requerida para activar la guanilato ciclasa, según se ha podido cuantificar con electrodos emplazados en células aisladas [Malinski, 1992]. Este hecho podría producir un efecto de saturación de la guanilato ciclasa o de citotoxicidad. Sin embargo, la mayor parte del NO se pierde en el compartimento vascular. Incluso una vez en el interior de una célula muscular lisa, la molécula de NO puede difundir de nuevo retrogradamente arrastrada por el citado gradiente de difusión.

Otros centros diana del NO son las proteínas poseedoras de un grupo Fe-S, como son la *cis* - aconitasa o la NADH:ubiquinona oxidorreductasa, entre otras. Estas enzimas se cree que pueden ser las promotores de la citotoxicidad dependiente del NO derivado de los macrófagos [Nathan, 1992].

El NO puede dirigirse también al hierro almacenado en la ferritina, resultando en la liberación de parte de este depósito. Este hecho puede tener implicaciones patológicas por la capacidad del hierro libre de promover peroxidación lipídica [Rief, 1990].

5.2 Reacción con grupos tiol

El NO (habitualmente a través de formas con mayor nivel de oxidación, como es el dióxido de nitrógeno) reacciona rápidamente con moléculas poseedoras de grupos sulfhidrilo o tiol, como son el glutatión, la cisteína o a la albúmina, dando lugar a los llamados S-nitrosotioles. Estas moléculas son detectables *in vivo* en concentraciones $< 1 \mu\text{M}$ [Stamler, 1992] y una de sus misiones es estabilizar y preservar la bioactividad del NO. La vida media en el plasma de los nitrosotioles puede ser de unos 40 minutos, en tanto que la del NO es de 1 a 10 segundos [Stamler, 1992b]. Su mayor estabilidad es motivada en parte porque los nitrosotioles no son inactivados por la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos. Además de prolongar la vida media del NO, los nitrosotioles pueden actuar como moléculas efectoras del NO.

El grupo sulfhidrilo de la **albúmina** es el tiol más abundante en plasma y en condiciones fisiológicas es particularmente reactivo con el NO. El resultado de esta unión es un compuesto estable, capaz de transportar el NO a lugares distantes de su origen, y biológicamente activo, demostrado por sus propiedades de vasodilatación y antiagregación plaquetar [Stamler, 1992b; Keaney, 1993].

Existen otras proteínas de diversa naturaleza cuya acción puede ser también controlada a través de un mecanismo de S-nitrosilación, como es el caso del activador del plasminógeno [Stamler, 1992a] o la NADPH oxidasa [Clancy, 1992], entre otras.

5.3 Reacción con el anión superóxido

Tanto el anión superóxido (O_2^-) como el NO tienen naturaleza de radical (es decir,

contienen un electrón impar en su última órbita). Cuando ambas moléculas se encuentran reaccionan rápidamente dando lugar a la formación de peroxinitritos (ONOO^-). La tasa de reacción de estos dos radicales es de $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, una velocidad 3 veces superior a la reacción del superóxido con otras moléculas como es la superóxido dismutasa.

Esta reacción representa un arma de doble filo. Su efecto beneficioso se manifiesta al retirar el exceso de NO y superóxido generado en algunas condiciones patológicas. Los peroxinitritos formados reaccionarán fácilmente con el glutatión (antioxidante natural que existe en alta concentración en las mitocondrias) neutralizándose así la reacción oxidativa. Sin embargo, el peroxinitrito es uno de los oxidantes más potentes que se conocen y si la formación de peroxinitritos acaba agotando las reservas de glutatión, se puede modificar la participación del NO en diversas cascadas enzimáticas, y puede ser directamente citotóxico debido a la extensa nitración proteica que ocasiona en residuos de proteínas (aspecto especialmente estudiado en enzimas mitocondriales).

6. Efectos fisiológicos del NO

En líneas generales, las funciones clásicas del NO son la vasodilatación, neurotransmisión y defensa inmunológica, dependientes de las respectivas acciones endotelial, neural e inducible de la NOS. No obstante, este esquema debe entenderse como una simplificación del complejo entramado funcional del NO. Este mensajero puede derivar de más de dos fuentes celulares y formar redes de comunicación paracrina. Si imaginamos una sección tisular de intestino que comprenda un vaso sanguíneo, una fibra muscular lisa y una terminal nerviosa miotérica, varias serán las fuentes celulares que de forma simultánea sintetizan NO. El endotelio y los nervios adventicios de la pared vascular producirán mediante isoenzimas diferentes una misma molécula de NO responsable del efecto vasodilatador. Asimismo, el NO generado por la NOS neural será el responsable de controlar la dilatación vascular y de relajar la musculatura lisa intestinal en el proceso de la peristalsis.

Hecha la reflexión sobre la complejidad de los efectos derivados del NO, las funciones fisiológicas dirigidas por el NO pueden simplificarse según el isoenzima de origen .

6.1 NO de Origen Endotelial

El NO generado en el endotelio vascular se reconoce como uno de los reguladores fisiológicos del tono vascular de mayor relevancia en el organismo. Este vasodilatador endógeno induce su efecto a través de la relajación de la célula muscular lisa que conforma la pared vascular. Este hecho fundamental en el control de la tensión arterial y la regulación de la perfusión tisular.

El efecto antitrombótico es otro de los aspectos relevantes que se asocian a esta molécula. La liberación basal de NO por parte del endotelio y de las propias plaquetas [Radomski, 1996] suprime, vía guanilato ciclasa [Moro, 1996] , el aumento de calcio intracelular y la consecuente activación plaquetar. Además, su actuación sinérgica con la prostaciclina inhibe la agregación e interviene activamente en revertir la agregación plaquetar.

Otras acciones del NO consideradas como vasoprotectoras son su acción inhibidora sobre funciones celulares diversas [Schmidt, 1994], como son la adhesión y activación leucocitaria [Kubes, 1991], degranulación mastocitaria [Eastmond, 1997], permeabilidad endotelial, migración y proliferación de células musculares lisas y de la íntima y la síntesis de endotelinas.

En resumen, el NO desarrolla una labor fundamental en la homeostasis vascular [Radomski, 1993] a través de su efecto en el tono vascular, coagulación, fibrinólisis y, en general, en la función endotelial y de las células musculares lisas vasculares.

6.2 NO de origen neural

El NO constituye un importante neurotransmisor en el nervioso central y periférico.

La isoenzima neural de la NOS se halla ampliamente distribuída por todo el **sistema nervioso central** de los mamíferos, donde su expresión se está presente en la casi totalidad de las neuronas (15% de las células cerebrales) siendo indetectable su presencia en las células gliales (85% de células restantes).

Como neurotransmisor del sistema nervioso central, al NO se le reconoce su participación en funciones tan importantes y diversas como son la memoria, la percepción del dolor, el control del flujo vascular cerebral y la visión entre otras [Schmidt, 1994].

En el **sistema nervioso periférico**, la actividad neural de la NOS se asocia a las llamadas fibras no adrenérgicas no colinérgicas (NANC) de los nervios periféricos que inervan la musculatura lisa del tracto gastrointestinal, vías aéreas y del sistema urogenital [Rand, 1995], así como médula adrenal, retina y vasos sanguíneos [Bredt, 1990].

En el tracto gastrointestinal la acción neurotransmisora del NO desarrolla a un efecto inhibidor de la musculatura lisa visceral a diferentes niveles, como son el esfínter esofágico inferior, estómago, intestino delgado, colon y esfínter anal [Sanders KM, 1992]. En el esfínter de Oddi también se ha observado inervación NANC que induce su relajación.

En el tracto urogenital el NO media la relajación de los cuerpos cavernosos responsable de la función erectil y la dilatación de la vesícula urinaria como mecanismo adaptativo. En la musculatura lisa traqueal las fibras NANC también inducen su relajación [Moncada, 1993].

B. MECANISMOS DE CONTROL DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA

1. INTRODUCCIÓN

El páncreas es un órgano mixto dedicado a una función endocrina y exocrina a su vez. La estructura endocrina constituye el 2% de la masa pancreática y está representada por los Islotes de Langerhans. En ellos se localizan las células A, B, D y PP encargadas de la síntesis de glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático, respectivamente. Estos elementos endocrinos se hallan dispersos en el páncreas exocrino, que conforma el 85% de la glándula. El resto del páncreas está formado por tejido conectivo, nervios y vasos sanguíneos.

El páncreas exocrino está dedicado a la digestión y asimilación de los nutrientes ingeridos. Para ello cuenta con dos elementos celulares de producción. Uno son las células acinares, especializadas en la síntesis, almacenamiento y secreción de enzimas digestivos (amilasa, lipasa, tripsina, etc.), y el otro las células ductales, encargadas de la síntesis de agua, electrolitos y bicarbonato. En un proceso coordinado por mecanismos neurales y hormonales íntimamente relacionados, la combinación de la producción acinar y ductal da como resultado el jugo pancreático. Este líquido alcalino y rico en enzimas es secretado al duodeno donde inicia la hidrólisis de carbohidratos, lípidos y proteínas de los alimentos que llegan al intestino.

La síntesis enzimática es un proceso complejo para el cual las células acinares disponen de una maquinaria sofisticada. La regulación de los mecanismos involucrados en la síntesis y secreción enzimática es complejo y no del todo conocido. En ella intervienen el sistema simpático y parasimpático, el plexo neural intrínseco, elementos peptidérgicos como el VIP, y hormonas como la colecistokinina.

2. LA CÉLULA ACINAR

La estructura funcional del páncreas exocrino se compone de acinos y de sus respectivos ductos de drenaje. Los acinos son agrupaciones de células acinares con fuertes uniones intercelulares y una polaridad secretora hacia la membrana apical. Las superficies apicales de todo el grupo celular delimitan la luz central del acino, a donde se vierte la secreción acinar. En la membrana basolateral se hallan los receptores para hormonas (CCK, secretina, bombesina) y neurotransmisores (acetilcolina, VIP, CGRP, etc.) responsables de estimular la síntesis y secreción enzimática. En el interior de la célula acinar se distingue la porción basal, que contiene el núcleo y abundantes retículos endoplásmicos rugosos encargados de la síntesis enzimática. En la región apical se encuentran los gránulos de zimógeno, dedicados a almacenar los enzimas en espera de ser secretados. El área central entre el núcleo y los gránulos de zimógenos es rica en complejos de Golgi. Un sistema de cisternas citoplasmáticas conduce los enzimas sintetizados en los ribosomas del retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi, de allí a los gránulos de secreción y finalmente a la luz acinar. De este modo los enzimas están en todo momento fuera del citoplasma celular en un espacio que en algún momento será extracelular.

Los ductos pancreáticos se originan en células centroacinares, intercaladas entre la luz acinar y el epitelio ductal, y drenan hacia los ductos interlobulares, que a su vez se dirigen al conducto pancreático principal. El epitelio ductal y las células centroacinares contienen anhidrasa carbónica, necesaria para la formación de bicarbonato. Las principales funciones del sistema ductal son segregar una solución alcalina que facilite el transporte de los enzimas digestivos hacia la luz intestinal y aumentar el pH intestinal para optimizar la digestión enzimática intestinal.

3. SEÑALES INTRACELULARES

La célula acinar varía su respuesta secretora dependiendo de las señales que recibe del medio exterior. Estas señales con influencia sobre los procesos de secreción son muy variadas y abarcan desde el reconocimiento de los apropiados contactos

externos (uniones intercelulares, anclaje a la matriz extracelular, homeostasis del medio, etc) hasta la adecuada sensibilidad a señales hormonales, vasculares y neurales.

La mayoría de hormonas y neurotransmisores que estimulan la secreción pancreática lo hacen tras la interacción con sus receptores localizados en la membrana de células acinares y ductales o, de forma indirecta, en receptores localizados en las terminaciones nerviosas o vasos sanguíneos. En las células acinares se han caracterizado diversos receptores que inducen secreción enzimática en respuesta a CCK, acetilcolina, VIP, PACAP (*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*), bombesina, sustancia P y CGRP (*calcitonin gene related peptide*) [Jensen, 1994]. Se han identificado otros receptores cuyas activaciones no inducen secreción enzimática, aunque pueden potencialmente modificarla, como son los receptores para la somatostatina, endotelinas, insulina y factor epidérmico de crecimiento.

La unión del agonista con el receptor de membrana desencadena diversas señales intracelulares que llevan a la estimulación o inhibición de la secreción celular. Estos mecanismos intracelulares continúan siendo motivo de estudio.

Según la vía intracelular utilizada para inducir el efecto secretor, los receptores acinares puede clasificarse en dos categorías. Una de ellas incluye los receptores para VIP, secretina, PACAP y CGRP, cuya vía de acción es a través del AMPc formado por la adenilato ciclasa. El otro grupo lo constituyen los receptores de CCK, acetilcolina, bombesina y sustancia P. Estos secretagogos no basan su efecto en cambios intracelulares de AMPc sino en el metabolismo de los fosfoinosítoles de membrana y en aumentos de la concentración intracelular de calcio [Jensen, 1994; Yule, 1994].

Uno de los principales efectos ocasionados por la interacción de la CCK, acetilcolina, bombesina y sustancia P con sus receptores respectivos es la movilización y liberación de los depósitos intracelulares de calcio. Ello es mediado por la hidrólisis que la fosfolipasa C realiza sobre un fosfolípido de membrana, el fosfatidil inositol difosfato, dando lugar a diacilgliceril (DAG) e inositol trifosfato

(IP₃) [Pandol, 1986; Rowley, 1990]. El IP₃ formado pasa al interior de la célula y libera los depósitos de calcio, no mitocondriales, sino posiblemente del retículo endoplásmico o de organelas especializadas denominadas "calciosomas" [Streb, 1983; Volpe 1988]. Ello se traduce en un rápido incremento de la concentración de calcio libre citosólico [Ca²⁺]_i que, si bien el mecanismo preciso no es bien conocido, se sabe que es responsable de la secreción pancreática [Muallem, 1989].

Esta oscilación de [Ca²⁺]_i es transitoria, volviéndose a rellenar los depósitos en 2-10 minutos. El paso de calcio extracelular al interior de la célula es necesario para la secreción enzimática mantenida. El DAG, que se mantiene en la membrana celular, parece participar en la secreción mantenida a través de la activación de una enzima fosforiladora calcio dependiente, la protein kinasa C (PKC) [Sung, 1988]. El sustrato o sustratos fosforilados por la PKC y que son claves para facilitar la secreción enzimática no son bien conocidos. Lo que si se sabe es que la PKC induce secreción enzimática, como también lo hace el aumento de [Ca²⁺]_i.

Otro efecto derivado de los agonistas que actúan a través de oscilaciones de [Ca²⁺]_i (ej: acetilcolina, CCK...) es el aumento citosólico de GMPc (3',5' guanosin monofosfato cíclico). A este mensajero se le ha atribuido una participación en la regulación de [Ca²⁺]_i intracelular [Pandol, 1990]. El bloqueo de la guanilato ciclasa con LY 83583 suprime el aumento de [Ca²⁺]_i inducido por carbachol en células acinares. Este efecto es revertido con nitroprusiato sódico. Otro aspecto, aunque controvertido, relativo a la función del GMPc es su reconocimiento por algunos autores como mediador en la secreción de amilasas [Haymovits, 1976] en tanto que es rechazado por otros [Heisler, 1978; Gunter, 1979; Gardner, 1980; Yoshida, 1997].

El óxido nítrico, una molécula endógena con variadas y reconocidas funciones biológicas a su cargo, desarrolla la mayor parte de sus efectos a través de la guanilato ciclasa, enzima precursor de la síntesis de GMPc. En las células acinares del páncreas existen diversas observaciones en torno a las interrelaciones entre GMPc, óxido nítrico y secreción enzimática [Gunter, 1979; Gardner, 1980; Iwatsuki

1986; Gukovskaya, 1994; Molero, 1995; Yoshida, 1997]. En conjunto, el efecto que el óxido nítrico ejerce sobre las vías moleculares responsables de la secreción pancreática no parece ser muy importante.

Aunque los primeros eslabones de la cadena estímulo-secreción (secretagogo/receptor-síntesis enzimática) es en parte conocida, los mecanismos por los que esta secuencia conduce al proceso secretor no son conocidos. Todos los mediadores intracelulares reconocidos como importantes en los procesos de secreción (Ca^{2+} , DAG, AMPc, GMPc) expresan sus efectos a través de mecanismos de fosforilación y defosforilación de las proteínas celulares mediados por kinasas y fosfatasas.

La combinación de un agonista que actúe a través del AMPc y de otro agonista que produzca cambios en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ originará sobre la célula acinar una respuesta secretora enzimática mayor que la adición de ambos efectos, como es el caso de la combinación de VIP o secretina con CCK o acetilcolina.

4 . SEÑALES EXTRACELULARES

En la regulación de la secreción pancreática exocrina interviene un complejo sistema de vías neurales, endocrinas y paracrinas íntimamente relacionadas desde el punto de vista funcional y anatómico. El control de la secreción pancreática debe por tanto entenderse como el resultado de la acción conjunta de señales supracelulares estimuladoras e inhibitoras que se integran en una respuesta final.

En el páncreas existen múltiples secretagogos que interaccionan entre ellos y con las células acinares dando lugar a una respuesta secretora exocrina . Los principales mediadores de la secreción pancreática son las vías colinérgicas vagales y la hormona colecistokinina. En la secreción postprandial la CCK es responsable del 50-60% de la secreción enzimática, en tanto que las vías colinérgicas vagales controlan el resto. Además de la acetilcolina y la CCK, otros elementos presentes en el páncreas participan también en la regulación de la secreción pancreática, como son el VIP (*polipéptido intestinal vasoactivo*) y GRP (*gastrin-releasing peptide*) -

péptidos activos identificados en fibras nerviosas intrapancreáticas- o el óxido nítrico - transmisor inter e intracelular detectado en células acinares, ganglios y nervios intrapancreáticos. La contribución relativa de cada uno de estos factores en la secreción pancreática y las interacciones que mantienen entre ellos no están del todo definidas.

4.1 Control hormonal. Colecistokinina.

En el circuito de señales que integran la respuesta secretora pancreática participan diversos péptidos y hormonas, que pueden clasificarse según su efecto estimulador o inhibidor de la secreción pancreática. Entre los primeros se hallan la colecistokinina, secretina, gastrina, neurotensina, motilina, insulina y péptidos intestinales liberadores de secretina y colecistokinina. En la segunda categoría hallamos el polipéptido pancreático, péptido YY, somatostatina, glucagón, pancreastatina y la hormona liberadora de tirotropina.

COLECISTOKININA (CCK)

La CCK constituye un mediador hormonal principal en los procesos digestivos. Además de estimular la secreción pancreática, sus efectos fisiológicos incluyen la contracción de la vesícula biliar, inhibición del vaciamiento gástrico y de la secreción ácida gástrica e inducción de la saciedad.

La CCK es sintetizada en células enteroendocrinas de la mucosa duodenal y yeyunal, en neuronas cerebrales y en neuronas del sistema autónomo periférico presentes en el plexo mientérico del intestino, páncreas y nervios vagos [Liddle, 1997].

La liberación de CCK en el intestino es estimulada principalmente por los productos de digestión de las grasas y las proteínas (ácidos grasos libres, monoglicéridos, aminoácidos, oligopéptidos) y en menor medida por las proteínas y grasas complejas (no digeridas) y por los carbohidratos. La secreción de CCK se inicia con el paso de nutrientes del estómago al duodeno y finaliza una vez las

proteínas, grasas y sus metabolitos abandonan el tramo superior del intestino.

Se reconocen dos mecanismos por los cuales la CCK estimula la secreción enzimática del páncreas. Uno de ellos es mediante su unión a receptores de CCK situados en las células acinares y el otro es a través de la interacción con fibras colinérgicas del sistema nervioso autónomo.

En su acción a través de receptores acinares, la CCK se comporta como una hormona. Bajo el estímulo adecuado, las células enteroendocrinas liberan a la circulación sanguínea CCK, posibilitando su llegada al tejido pancreático donde se une a su receptor de membrana en las células acinares. Esta interacción hormona-receptor desencadena la respuesta secretora acinar. En condiciones de ayunas, la concentración en sangre de CCK medida en diferentes mamíferos es baja, en torno a 1 pM. Tras la ingesta de una comida rica en grasas y proteínas la concentración aumenta a 5-10 pM en 10-30 minutos, siguiéndose de un descenso gradual hasta alcanzar niveles basales en unas tres horas [Owyang, 1995; Liddle, 1997]. La infusión endovenosa de CCK en una cantidad que reproduzca los niveles plasmáticos posprandiales induce una estimulación de la secreción enzimática similar a la obtenida tras una comida [Beglinger, 1985]. Ello refleja que la CCK es el principal regulador de la secreción pancreática inducida por la comida. Otras evidencias que apoyan la acción fisiológica de la CCK en la secreción enzimática han sido obtenidas a través de antagonistas de los receptores de CCK. Estos antagonistas inhiben la secreción de amilasas estimulada por CCK tanto *in vitro* (acinis dispersos) como en ratas anestesiadas [Niederau, 1989] y ocasionan una disminución del 50-60% de la secreción enzimática en respuesta a la ingesta en ratas conscientes [Hosotani, 1989; O'Rourke, 1990].

Por otra parte, algunos autores proponen las fibras neurales colinérgicas como el mecanismo de acción predominante de la CCK en la estimulación de la secreción enzimática posprandial [Owyang, 1996], comportándose en esta ocasión como neurotransmisor. Apoyan este mecanismo estudios realizados en ratas anestesiadas, en los que se ha comprobado que tanto la atropina (antagonista de los receptores muscarínicos), el hexametonio (bloqueante ganglionar) como la

vagotomía suprimen completamente la secreción enzimática en respuesta a la administración de concentraciones fisiológicas de CCK [Li, 1993]. Estos estudios confirman observaciones previas sobre la reducción de la secreción pancreática basal y la estimulada por nutrientes tras la vagotomía [Adler, 1991; Solomon, 1994] así como una menor respuesta secretora obtenida con dosis bajas de CCK en pacientes vagotomizados [Malagelada, 1974].

A través de estudios autorradiográficos *in vitro* se han detectado receptores para CCK tipo A y B en las fibras sensoriales aferentes vagales [Zarbin, 1981; Moriarty, 1997]. Estos receptores son sintetizados en las células de los ganglios nodosos del vago y viajan por los axones neuronales hacia las terminales nerviosas periféricas. Estas fibras sensoriales constituyen el brazo aferente del circuito nervioso vago-vagal que recoge estímulos sensoriales originados en el pexo mientérico gastrointestinal y en el páncreas, los transmite a centros nerviosos superiores y retorna la respuesta a través de fibras aferente vagales a la célula efectora. De este modo, los receptores de CCK situados en el vago actúan de mediadores las diferentes funciones que la CCK realiza a través de reflejos vago-vagales, como son inhibición del vaciado gástrico y la saciedad [Raybould, 1988]. Estudios en ratas han demostrado que la CCK a dosis fisiológicas estimula la secreción pancreática a través de fibras capsaicin-sensibles aferentes del vago originadas en la mucosa duodenal. La destrucción de estas fibras mediante capsaicina (neurotóxico selectivo para fibras no mielínicas tipo C o sensoriales aferentes del vago) anula el efecto secretor de la CCK [Ly, 1993; Ly, 1994]. Los receptores vagales encargados de mediar el efecto secretor de la CCK son los receptores CCK-A de alta afinidad [Ly, 1997], diferentes de los encargados de procesar otras acciones gastrointestinales de la CCK, como es la saciedad o el vaciamiento gástrico. Sin embargo, la actuación de la CCK a través de vías neurales colinérgicas es todavía motivo de debate [Guan, 1996].

Un aspecto característico del patrón de secreción enzimática estimulada por CCK es la curva dosis-respuesta. Estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la secreción enzimática del páncreas en respuesta a dosis crecientes de CCK (o de su análogo ceruleína) revelan un patrón bifásico de secreción: estimulación con altas dosis de

CCK e inhibición con dosis supramáximas. En humanos sanos se observa que la infusión de 30.7 pmol/kg/h de CCK8 induce una secreción máxima pancreática y que al incrementar la dosis disminuye la respuesta [Fushiki, 1989]. En acinis dispersos la curva dosis-respuesta muestra una liberación máxima de amilasas frente a concentraciones de 0.1 nM de ceruleína, en tanto que concentraciones superiores inducen una menor respuesta. En ratas anestesiadas la infusión de dosis óptimas de CCK (0.25 µg/kg) genera una respuesta máxima de la secreción de amilasas, en tanto que dosis superiores ocasionan inhibición de la secreción [Niedermaier, 1989; Molero, 1995].

Este efecto inhibitorio sobre la secreción enzimática se cree que es en parte debido a alteraciones morfológicas en el citoesqueleto apical de la célula acinar generadas por altas concentraciones de CCK (o de su análogo ceruleína). De este modo, dosis supramáximas de CCK causan una rápida desestructuración de microtúbulos y microfilamentos apicales encargados de dirigir a los gránulos de zimógeno a la luz acinar, ocasionando una inhibición de la secreción pancreática [O'Konski, 1990]. Otro argumento que explica este patrón de respuesta según la dosis de CCK es la existencia de receptores acinares para CCK de alta y baja afinidad.

4.2 Control neural

NEUROTRANSMISION VAGAL

El conocimiento del control colinérgico de la secreción pancreática se basa en múltiples observaciones experimentales. Los efectos *in vitro* se resumen en la estimulación directa de la acetilcolina sobre células acinares a través de receptores muscarínicos (•30=) y la inhibición de tal efecto con atropina. *In vivo* la secreción enzimática se estimula con betanecol (agonista colinérgico) y mediante la estimulación eléctrica del vago y se inhibe con atropina y con hexametonio (bloqueante ganglionar) pero no con L 364718 (antagonista del receptor de la CCK) [O'Rourke, 1991; Nelson 1993].

Las vías colinérgicas intervienen en el control de la secreción pancreática

interdigestiva así como en las tres fases clásicas de la secreción posprandial.

Estudios en ratas sugieren que la innervación vagal constituye el mediador principal en mantener la secreción enzimática basal del páncreas [O'Rourke, 1991].

SISTEMA SIMPÁTICO

La estimulación de los nervios espláncnicos o la infusión de fenilefrina inhibe la secreción exocrina y endocrina. Este efecto puede depender de la intensa vasoconstricción originada con la hiperreactividad adrenérgica. La administración de fentolamina, un bloqueante α adrenérgico, aumenta la secreción enzimática [Layr, 1992].

SISTEMA NERVIOSO PEPTIDÉRGICO

La estimulación de las fibras nerviosas del páncreas ocasiona no únicamente la liberación de los clásicos neurotransmisores como la acetilcolina, sino también de neuropéptidos. Estudios inmunohistoquímicos han identificado numerosos péptidos en las neuronas pancreáticas. Estos pueden ejercer un efecto estimulador sobre la secreción pancreática, como son el VIP (*vasoactive intestinal polipeptide*), GRP (*gastrin-releasing peptide*), CCK, neurotensina y sustancia P, o inhibitorio, como son el CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), galanina, encefalina y neuropéptido Y [Chey, 1993].

5. ANATOMÍA FUNCIONAL DEL PÁNCREAS

El páncreas exocrino está innervado por un rico y complejo sistema neural formado por neuronas simpáticas y parasimpáticas, fibras sensoriales aferentes, neuronas peptidérgicas y fibras nitrérgicas contenedoras del enzima óxido nítrico sintasa.

5.1 Fibras parasimpáticas y simpáticas

La innervación visceral pancreática depende de las fibras aferentes del vago

(inervación parasimpática o colinérgica) y de los nervios espláncnicos (inervación simpática o adrenérgica).

Las fibras parasimpáticas llegan al páncreas directamente a través de los nervios vagos e indirectamente a través del ganglio celíaco, nervios espláncnicos y posiblemente a través del plexo intramural del duodeno. Estas fibras preganglionares llegan a los ganglios intrapancreáticos, de donde salen las fibras posganglionares que proporcionan inervación a las células acinares, Islotes de Langerhans y ductos pancreáticos. La neurotransmisión en los ganglios es mediada por la acetilcolina a través de receptores nicotínicos y es bloqueada por hexametonio. Las terminaciones nerviosas postganglionares liberan acetilcolina, que se une a receptores muscarínicos en las células acinares induciendo la secreción enzimática [Larose, 1981]. Estos receptores son bloqueados por atropina y estimulados por betanecol o acetilcolina.

La inervación simpática del páncreas procede de los nervios espláncnicos. Desde la médula espinal comprendida entre C8 y L3 viajan las fibras preganglionares hasta los ganglios paravertebrales o ganglio celíaco, de donde salen las fibras postganglionares hasta el páncreas. La mayor parte de estas fibras se dirige a los vasos sanguíneos y en una pequeña proporción a ductos y acinis. El neurotransmisor preganglionar es la acetilcolina y el postganglionar la norepinefrina. La acetilcolina ejerce su efecto en los ganglios paravertebrales y celíaco a través de los receptores nicotínicos y en las células del páncreas a través de los receptores simpáticos α y β .

5.2 Fibras capsaicínicas

A través de los nervios vagos circulan fibras sensoriales aferentes que transportan estímulos a centros integradores de información situados en regiones medulares del cerebro. La mayoría son fibras no mielinizadas tipo C y en menor proporción fibras poco mielinizadas tipo A- δ . Las fibras sensoriales aferentes representan más del 90% de las fibras vagales y no forman parte del sistema nervioso autónomo. A ellas se les reconoce con el nombre fibras capsaicin-sensibles por ser destruidas

selectivamente por la capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida), compuesto picante del capsicum. En el eje vago-vagal, este neurotóxico elimina las fibras sensoriales aferentes sin afectar el resto de neuronas que completan el circuito (neuronas de segundo orden del núcleo del tracto solitario y fibras eferentes del vago).

Las fibras capsaicin-sensibles contienen diferentes neuropéptidos, como son la el CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) o la sustancia P, cuya liberación media diferentes funciones. La administración aguda de elevadas dosis de capsaicina conduce a la desensibilización de estas fibras principalmente a través de la liberación masiva de neuropéptidos y consiguiente la deplección de estos neurotransmisores [Fitzgerald, 1983]. El tiempo necesario para conseguir la desensibilización puede variar desde 10 minutos hasta varios días dependiendo del modelo utilizado.

Mediante estudios de fluorescencia con tinción retrógrada de True Blue se han identificado fibras capsaicin-sensibles en páncreas, estómago y duodeno [Sharkey, 1984]. Estas fibras poseen receptores CCK a través de los cuales la colecistokina a dosis fisiológicas estimula la secreción pancreática. Así mismo, la estimulación de receptores de volumen, presión y osmolaridad presentes en el duodeno inducen la secreción enzimática del páncreas a través de vías neurales sensoriales aferentes. La destrucción de estas fibras mediante la aplicación perivagal de capsaicina anula la secreción pancreática estimulada por CCK [Li, 1993; Li, 1994] o por estímulos no dependientes de CCK (osmorreceptores, chemorreceptores y mecanorreceptores duodenales) [Li, 1996].

5.3 Inervación enteropancreática

El páncreas recibe también proyecciones neuronales procedentes directamente del intestino [Anglade, 1987; Kirchgessner, 1990]. A este sistema se le conoce como inervación enteropancreática. Parte de la inervación pancreática, por tanto, podría ser entendida como una extensión del sistema neural entérico. El significado funcional de estas neuronas es todavía desconocido, pero posiblemente puedan

modular de forma directa la actividad secretora del páncreas.

La mayor parte de la innervación enteropancreática está compuesta por fibras colinérgicas que viajan desde el duodeno hasta los ganglios intrapancreáticos, donde proporcionan sinapsis excitatorias nicotínicas [Kirchgessner, 1990]. Otra subpoblación de neuronas enteropancreáticas son las fibras serotoninérgicas [Kirchgessner, 1990] y las NADPH-diaforasa (es decir, que contienen NOS neural) [Kirchgessner, 1994].

Las fibras serotoninérgicas halladas en el páncreas parecen tener un origen exclusivamente entérico. Estas fibras forman sinapsis axo-axónicas inhibitorias en el páncreas, de modo que la serotonina inhibe la mediación neural de la secreción de amilasas [Kirchgessner, 1995].

5.4 Fibras nitrérgicas

Mediante estudios histológicos con NADPH diaforasa se ha detectado en páncreas de diferentes mamíferos (humanos, ratas, cobayas, ratones, gatos) la presencia de la sintasa del NO (NOS) en el endotelio, neuronas, ganglios e Islotes de Langerhans, aunque no en las células acinares [Shimosegawa, 1992; Ekblad, 1994; Kirchgessner, 1994]. Estudios morfológicos en páncreas de cobayas demuestran la existencia de una alta proporción de neuronas inmunorreactivas para NOS en ganglios intrapancreáticos y fibras interganglionares localizadas en torno a acinis, Islotes de Langerhans y vasos. Gran parte de estas neuronas son colinérgicas (presentan inmunorreactividad para colinacetiltransferasa) y únicamente las localizadas en torno a los vasos sanguíneos son no colinérgicas [Liu, 1997]. La actividad NADPH-diaforasa está presente también en las proyecciones neuronales entre duodeno y páncreas, formando parte de la innervación enteropancreática [Kirchgessner, 1994].

La evidencia de una innervación nitrérgica en el páncreas sugiere que el NO puede desarrollar una regulación neural de la secreción exocrina pancreática. Estudios en lóbulos pancreáticos aislados demuestran que la secreción de amilasas es estimulada por arginina (sustrato de la NOS) y que la N^G-nitro-L-arginina

(inhibidor de la NOS) evita el efecto estimulador de la L-arginina pero no altera la secreción de amilasas estimulada por carbacol [Kirchgessner, 1994].

II PARTE EXPERIMENTAL

1. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1.1 HPÓTESIS

- El óxido nítrico ejerce una acción moduladora sobre la secreción pancreática que requiere la integridad de las diferentes vías nitrérgicas pancreáticas para mantener los patrones normales de secreción exocrina.
- La conducción neural nitrérgica interviene en el control de la secreción y participa en la respuesta tisular ante la pancreatitis aguda.
- La gravedad del daño tisular local generado en la pancreatitis aguda es en parte dependiente de los productos de metabolización del óxido nítrico sintetizado durante la respuesta inflamatoria aguda.

1.2 OBJETIVOS

- Identificar mediante manipulación farmacológica los efectos *in vivo* de la inhibición del óxido nítrico en la secreción exocrina pancreática y su relación con la vía nitrérgica afectada.
- Investigar el resultado de la inhibición selectiva del isoenzima neural de la sintasa del óxido nítrico sobre la severidad de la pancreatitis aguda por ceruleína.
- Estudiar la participación del óxido nítrico en el desarrollo y gravedad de la lesión tisular local en la pancreatitis aguda.

2. METODOS

2.1 MATERIALES

Los reactivos fueron adquiridos a los siguientes proveedores:

Aceite de cacahuete. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Acido etilendiaminotetraacético (EDTA). Sigma-Aldrich Química S.A.
Alcobendas, Madrid.

Acido α -ketoglutarico. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Albúmina sérica bovina. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Aminoguanidina. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Anticuerpo anti-iNOS. Cedido por Dr. Salvador Moncada.

Anticuerpo anti-nitrotirosina. Upstate Biotechnology. Lake Placid, NY, U.S.A.

Catéter de polietileno. Portex Limited. SIMS Industries. Hythe, Kent,
England.

Capsaicina. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Catalasa de *Aspergillus niger*. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas,
Madrid.

Ceruleína sulfatada sintética. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas,
Madrid.

Ditionito sódico. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Etanol absoluto. Merck. Darmstadt, Alemania.

Glutamato deshidrogenasa de hígado bovino. Boehringer Mannheim. GmbH.

Hexadeciltrimetil-amonium bromide (HDAB). Sigma-Aldrich Química S.A.
Alcobendas, Madrid.

Hemoglobina bovina. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Indazol. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Ketamina. Ketolar®. Parke-Davis, S-L, Barcelona.

Microcon 3. Amicon Inc. Beverly, MA, U.S.A.

L-NAME. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

β -NADPH, sal tetrasódica. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

N,N'-dimetilformamida. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Nitrato reductasa de *Aspergillus species* (lío­filizado). Boehringer Mannheim GmbH.

Nitrito sódico. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Pentobarbital sódico. Nembutal®, Laboratorios Abbott, North Chicago, IL, U.S.A.

Péptido de activación del tripsinógeno. Biotrin. Dublín, Irlanda.

Sulfanilamida. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Taurocolato sódico. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

3,3',5-5'-tetrametilbenzidina (TMB). Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Tween 80. Sigma-Aldrich Química S.A. Alcobendas, Madrid.

Xilazina. Rompun®, Bayer, Leverkusen, Alemania.

2.2 ANIMALES

Todos los experimentos se realizaron en ratas macho Sprague-Dawley, de 300-320 g de peso. Los animales se mantuvieron en estabulario de acceso restringido, con temperatura controlada de 23 ± 1 °C y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas cada uno. Las ratas se mantuvieron en un número máximo de 5 por jaula, y se alimentaron con comida estandar para roedores.

2.3 METODOLOGÍA

Los estudios de secreción pancreática se realizaron en ratas anestesiadas con ketamina (dosis de inducción anestésica 100 mg/kg por vía i.p y mantenimiento con un tercio de esta dosis por vía i.m. según las necesidades). En las ratas tratadas con indazol, dado su efecto depresor sobre el sistema nervioso central, fue preciso practicar traqueostomía para asegurar una adecuada ventilación.

Los estudios de pancreatitis aguda se realizaron en ratas conscientes cuando se indujo pancreatitis edematosa y bajo anestesia (inducción con pentobarbital sódico

50 mg/kg por vía i.p. y mantenimiento con ketamina + xilacina por vía i.m) sólo durante el tiempo necesario para permitir la manipulación quirúrgica en el proceso de inducción de la pancreatitis necrohemorrágica.

Todos los experimentos se realizaron tras un período nocturno de ayunas de 16 a 18 horas.

2.3.1 Análisis de la secreción exocrina pancreática *in vivo*

Para el análisis de la secreción pancreática *in vivo* se utilizó el modelo descrito por Niederau y col. [Niederau, 1989]. En la rata anestesiada se colocó catéter de polietileno (PE de calibre fino, DI 0.28 mm, DE 0.61 mm) para la administración de fármacos o de suero fisiológico, que se conectó a una bomba de infusión (Modelo Asid Bonz PP 50-300. Sohn GmbH. Böblinhen, Alemania) para permitir un flujo continuado de suero fisiológico a 3 ml/h. Seguidamente se procedió a laparotomía media, obertura longitudinal del duodeno y canulación del conducto biliopancreático a través de la papila de Vater con cánula de polietileno (DI 0.58, DE 0.96).

La recogida de la secreción pancreática se inició transcurridos 30 minutos de drenaje libre del jugo biliopancreático por la cánula biliar. Este **período de equilibrado** se establece para evitar el aumento de la secreción pancreática observado en ratas anestesiadas durante los 30-45 minutos siguientes a la derivación biliopancreática. Transcurrido este intervalo de tiempo, la secreción pancreática se mantiene elevada durante más de una hora [Green, 1972. Fushiki, 1987].

Tras los 30 minutos de equilibrado se inició la recogida de la secreción en 6 fracciones consecutivas de diez minutos durante un período total de una hora en viales prepesados Eppendorfs. En cada una de las muestras recogidas se estimó el volumen según el peso del fluído y se calculó la producción enzimática mediante la determinación de la actividad de amilasas (U/L). Las dos primeras fracciones de 10 minutos fueron consideradas como **período basal** de la secreción, y su débito enzimático global se calculó en base a la media de la producción de amilasa de ambas muestras. Al finalizar los 20 minutos del período basal (**tiempo 0**) se

administró en experimentos independientes suero fisiológico (400 µl, bolus e.v.) o ceruleína a dosis diferentes (0.1, 0.25, 1, 10 o 50 µg/kg, en un volumen final de 400 µl en bolus i.v.). El débito total de amilasas correspondiente a las siguientes 4 fracciones de 10 minutos se estableció como el valor de la **secreción pancreática no estimulada** (tras administración de suero fisiológico) o **estimulada** (tras administración de ceruleína), y sus valores se expresaron como U de amilasa/10 minutos o como U de amilasa/40 minutos.

Para la determinación de la actividad de amilasas se utilizaron alícuotas de 200 µl de jugo biliopancreático diluídas entre 1:100 y 1:1000. El análisis de la actividad se realizó con el test colorimétrico α -Amilasa P-Amy (Boehringer Mannheim Systems) mediante lectura por sistema BM/Hitachi 717.

Es conocido el hecho de que la secreción basal pancreática tiende a fluctuar espontáneamente [Dale, 1989] y que cíclicamente presenta picos de secreción, aproximadamente cada dos horas [Maouyo, 1995]. Para evitar el efecto de tales variaciones sobre la producción basal de amilasas el análisis de la secreción se estandarizó expresando el débito de amilasas del período de respuesta como porcentaje de variación respecto al valor del período basal.

Para evitar la pérdida de calor y la deshidratación, los experimentos se realizaron con protección de la incisión abdominal mediante gasa humedecida en suero fisiológico y bajo fuente de calor generado con lámpara eléctrica.

2.3.2 Medición de la presión arterial

El control de la tensión arterial se llevó a cabo en las ratas sometidas a estudio de la secreción pancreática. El objetivo de estas determinaciones fue obtener una medida indirecta del efecto endotelial dependiente de óxido nítrico derivado de los fármacos administrados. Los estudios se realizaron en ratas anestesiadas a las que se colocó en arteria carótida catéter de polietileno (PE-50) heparinizado conectado a un transductor de presión (Hewlett Packard, 78205 A). Durante los 60 minutos de duración del experimento se efectuó registro numérico continuo de la presión

media arterial (PMA). En los 20 minutos iniciales se obtuvo la PMA basal y en los 40 minutos siguientes se registró la PMA en respuesta a diferentes fármacos (L-NAME, hemoglobina, ceruleína, albúmina, indazol) administrados 2 minutos antes del tiempo 0.

El mismo catéter arterial se utilizó para extracción de sangre antes de realizar la infusión de hemoglobina.

2.3.3 Inducción de la pancreatitis aguda

2.3.3.1 PANCREATITIS AGUDA EDEMATOSA

La pancreatitis aguda edematosa se indujo mediante la hiperestimulación pancreática con dosis supramáximas de ceruleína (péptido sintético con la misma actividad biológica que la colecistokinina). La administración de ceruleína en una cantidad 10-20 veces superior a la dosis secretora máxima conduce al desarrollo de edema pancreático, vacuolización acinar, infiltrado inflamatorio intersticial, necrosis acinar menor y aumento de los niveles plasmáticos de enzimas pancreáticos [Lampel, 1977]. Estos cambios tienen lugar en las primeras horas tras iniciar la hiperestimulación hormonal, siendo máximos entre las 3 y 6 horas, y tienden a la completa resolución al cabo de 8-10 días.

Sobre el modelo inicial descrito por Lampel y col. se han realizado múltiples modificaciones referentes a la dosis y vía de administración de la ceruleína, todas ellas dando origen a un cuadro de pancreatitis edematosa muy reproducible. En el presente estudio la pancreatitis edematosa fue inducida mediante la inyección i.p. de dos dosis de 20 µg/kg de ceruleína, administradas en el intervalo de 1 hora.

2.3.3.2 PANCREATITIS AGUDA NECROHEMORRÁGICA

Para desarrollar lesiones severas en el páncreas se utilizó el método descrito por Aho y col. [Aho, 1980] con algunas modificaciones. Este modelo se basa en el desarrollo de pancreatitis necrohemorrágica tras la inyección retrógrada de taurocolato sódico en el conducto común biliopancreático. La aplicación intraductal

de esta sal biliar genera en pocos minutos lesiones en el páncreas que son muy prominentes a las 3 a 6 horas de la inducción. Los cambios histológicos más característicos son las hemorragias y la necrosis acinar masiva en la cabeza pancreática, la infiltración inflamatoria y necrosis de la grasa peripancreática, y una afectación menor del cuerpo y cola [Aho, 1980].

La inducción de la pancreatitis se realizó en ratas que se mantuvieron anestesiadas durante todo el procedimiento quirúrgico (pentobarbital sódico 50 mg/kg, i.p y mantenimiento con ketamina y xilacina, i.m.). Tras practicar laparotomía media y obertura longitudinal del duodeno se canuló con catéter de polietileno (PE, DI 0.58, DE 0.96) el conducto biliopancreático común a través de la papila de Vater. Se efectuó ligadura de dicho conducto a nivel del hilio hepático con hilo de seda 2-0 y posteriormente se inyectaron 400 µl de taurocolato sódico en una solución al 5% en suero fisiológico. La inyección se realizó de forma manual con jeringa Hamilton en un tiempo mínimo de 8 minutos. Finalizada la aplicación de la sal biliar se retiró el catéter, se liberó la ligadura del conducto biliopancreático a nivel del hilio hepático y se suturaron las incisiones de duodeno y pared abdominal para evitar la pérdida de líquido y de calor corporal. Durante todo el período postanestésicos, las ratas se mantuvieron bajo temperatura controlada mediante calor generado por fuente de luz.

2.3.4 Medicion de los parámetros de gravedad de la lesión pancreática

2.3.4.1 EXAMEN HISTOLÓGICO

Los páncreas extraídos fueron preservados inmediatamente en formol tamponado al 10%, y posteriormente incluidos en parafina, cortados en secciones de 5 µ y teñidos con hematoxilina-eosina. El estudio de todas las muestras fue realizado por un patólogo experimentado (Dr. Antonio Salas), quien valoró la lesión pancreática según la existencia e intensidad de las siguientes alteraciones: edema, necrosis acinar, necrosis de la grasa peripancreática, hemorragias, vacuolización acinar e infiltrado inflamatorio.

2.3.4.2 ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE AMILASAS

La actividad de amilasas se determinó en alícuotas de 200 µl de plasma dilución 1:1000. El análisis de la actividad se realizó con el test colorimétrico α -Amilasa P-Amy (Boehringer Mannheim Systems) mediante lectura por sistema BM/Hitachi 717. Este test enzimático determina cuantitativamente la α -amilasa tipo P (pancreática), la cual se forma casi exclusivamente en el páncreas. Los resultados se expresan en U/L.

2.3.4.3 CUANTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA TISULAR

Como índice del grado de infiltración leucocitaria en el tejido pancreático se utilizó la actividad enzimática de la mieloperoxidasa (MPO), que fue cuantificada mediante ensayo de peroxidación siguiendo el método de Grisham y col. [Grisham, 1990]. Esta peroxidasa se halla contenida en los neutrófilos, eosinófilos y monocitos, aunque son los neutrófilos las células predominantes en la respuesta inflamatoria aguda.

La determinación de MPO se realizó en páncreas que, tras su extracción, fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y guardados a -80°C. Una vez descongeladas y pesadas las muestras de tejido, éstas se homogeneizaron en 10 volúmenes (peso/vol) de tampón fosfato potásico 20 mM (pH 7.4) con homogeneizador tisular durante 20 segundos y el homogenado resultante se centrifugó a 17.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se desechó por ser la fracción donde se hallan la mayoría de proteínas y substratos citosólicos (hemoglobina, mioglobina, catalasa, ascorbato, glutatión reducido), los cuales pueden interferir en el resultado. El precipitado, que contiene más del 90% de la actividad total MPO, fue resuspendido en 1 ml de ácido acético 50 mM (pH 6) con 0.5% (peso/vol) de HDTAB (hexadeciltrimetil-amonio bromide) y EDTA 10 mM. Para solubilizar la mayor parte posible de MPO, la muestra fue congelada, descongelada y sonicada durante 30 segundos a 50 w. En el homogenado resultante se midió la actividad MPO en base a la oxidación de la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) dependiente de la acción H_2O_2 , que da lugar a un

cromógeno azul con una longitud de onda máxima a 655 nm. Para ello, a 50 µl de muestra se añadieron 0.5 ml del siguiente tampón: fosfato potásico 80 mM (pH 5.4), 0.5% (peso/vol) de HETAB y 1.6 mM de TMB, éste último desde una solución 10 mM preparada en N,N'-dimetilformamida. La mezcla se calentó a 37°C durante 5 minutos, se añadió H₂O₂ 0.3 mM y se incubó a 37°C durante 3 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición en primer lugar de catalasa (20 µg/ml) y a los tres minutos de 2 ml de acetato sódico 0.2 M (pH 3). Se colocaron las muestras en hielo y se leyó la absorbancia a 655 nm mediante espectofotómetro Shimadzi UV-160A.

Una unidad de actividad MPO se definió como la cantidad de enzima que produce un cambio de 1.0 en la absorbancia por minuto a 37°C. Los resultados fueron expresaron en unidades por 100 mg de proteínas. Cada una de las muestras se procesó por duplicado.

2.3.4.4 MEDICIÓN DE PÉPTIDOS DE ACTIVACION DEL TRIPSINÓGENO

Los péptidos de activación del tripsinógeno (TAP) reflejan la conversión enzimática del tripsinógeno en tripsina, que en condiciones fisiológicas tiene lugar en el intestino por acción de las enterokinasas. En la pancreatitis aguda la inadecuada activación de proteasas en el páncreas da lugar a la producción extraluminal de estos péptidos. La concentración de TAP en tejido pancreático, plasma, ascitis y orina se correlaciona con el grado de lesión pancreática (especialmente con la necrosis acinar) y con la mortalidad de la pancreatitis aguda experimental. En el presente estudio, nosotros determinamos la concentración de TAP en páncreas porque ofrece una alta correlación con la gravedad de lesión pancreática, tanto en la pancreatitis edematosa como en la necrohemorrágica. En plasma y orina, la cuantificación de este péptido presenta la limitación de infravalorar la lesión ocurrida en la forma necrohemorrágica debido a que la deficiente perfusión tisular impide la llegada del TAP generado en páncreas a la circulación sanguínea [Foitzik, 1995].

Para determinar la concentración de TAP se utilizaron dos muestras de cada

páncreas, de unos 100 mg cada una, preservadas a -80°C tras su extracción. En una proporción 100 mg/ml, los tejidos fueron incluidos en tampón Tris-HCl 0.2 M más EDTA 20 mM, pH 7.3, e inmediatamente hervidos a 100°C durante 15 minutos con el fin de desnaturalizar la actividad de las proteasas pancreáticas. Seguidamente las muestras fueron homogeneizadas automáticamente (Tissue Tearor. Modelo 985-370. Biosnec Products, Inc. Racine, WI, U.S.A.) durante 15 segundos y centrifugadas (1400 g, 10 minutos, 4°C). El sobrenadante obtenido fue recogido en alícuotas y guardado a -80°C hasta su análisis. La cuantificación de TAP se realizó mediante kit comercial de enzimo inmuno ensayo (Trypsinogen Activation Peptide, Biotrin. Dublin, Irlanda).

2.6 Medición de nitritos/nitratos en sangre

La concentración de óxido nítrico en plasma se determinó indirectamente a través de la cuantificación de nitritos y nitratos (principales metabolitos del NO) mediante la reacción de Griess según el método descrito por Hevel y col. [Hevel, 1994]. En este procedimiento colorimétrico los nitratos son reducidos a nitritos mediante la acción de la nitrato reductasa. En medio ácido los nitritos reaccionan con el ácido sulfanílico dando origen a un compuesto diazoico, el cual produce al reaccionar con el naftileno diamino dihidrocloro un compuesto color púrpura con un espectro de absorción característico. Los nitratos no producen esta reacción con la sulfanilamida, por lo que en este método deben ser siempre reducidos previamente a nitritos para reaccionar con los reactivos de Griess.

Para la reducción de nitratos a nitritos, las muestras plasmáticas fueron incubadas con nitrato reductasa (60 mM) en presencia de NADPH (25 µM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, y con el fin de retirar el exceso de NADPH que podría interferir con el reactivo de Griess, se realizó incubación de las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente con L-glutamato deshidrogenasa (200 mU) , cloruro amónico (100 mM) y ácido α-ketoglutarico (4 mM). Finalmente se procedió a la reacción de los nitritos con el reactivo de Griess (0.1% naftaleno diamino dihidrocloro y 1% de sulfanilamida en ácido fosfórico al 5%) durante 5 minutos a 37°C. La absorbancia fue medida a 543 nm mediante

espectrofotómetro Shimadzu UV-160A. Todas las muestras fueron determinadas por duplicado.

2.7 Estudios inmunohistoquímicos en tejido pancreático

Los exámenes inmunohistoquímicos se realizaron en páncreas procedentes de ratas sometidas a la inducción de pancreatitis edematosa o pancreatitis necrohemorrágica, así como de los respectivos grupos control tratados con suero fisiológico intraperitoneal o intraductal. Las muestras de tejido pancreático fueron fijadas tras su extracción en formol tamponado al 10% y posteriormente incluidas en parafina.

En estas muestras se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para la detección del **isoenzima inducible de la NOS** mediante anticuerpo policlonal de conejo anti-iNOS (cedido por el Dr. Salvador Moncada).

Con el fin de averiguar si este isoenzima, además de expresarse en el tejido agredido, participa de forma activa en el desarrollo de la lesión pancreática, se investigó la presencia de **nitrotirosina** mediante inmunotinción del páncreas con un anticuerpo IgG monoclonal de ratón anti-nitrotirosina. Este aminoácido nitrado constituye un marcador de la nitración proteica ocasionada por formación y actividad del peroxinitrito, un potente oxidante derivado de la metabolización del óxido nítrico al reaccionar con el radical superóxido.

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron mediante el método de Streptavidina-Biotina-peroxidasa (Biomedica Corp., Foster City, CA, U.S.A.). Se prepararon secciones de tejido parafinado de 5 micras de grosor que fueron incluidas en peróxido de hidrógeno al 0.03% en metanol. La reactividad proteica inespecífica fue bloqueada mediante incubación con Redusol (Biomedica Corp., Foster City, CA, U.S.A.). Se secaron los tejidos para retirar el exceso de suero añadido y se incubaron durante 10 minutos con el anticuerpo anti-iNOS o anti-nitrotirosina diluido (1:2000 para iNOS; 1:100 para nitrotirosina). A continuación se efectuaron incubaciones sucesivas con el anticuerpo secundario biotinilado y

con el complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (Universal LSAB kit/HRP, DAKO Corp., Glostrup, Denmark) durante 10 minutos cada una.

Para revelar la actividad de la peroxidasa se incubaron las muestras durante 4 minutos con el agente cromógeno diaminobenzidina. Finalmente se realizó contratección con Hematoxilina, deshidratación y montaje de las muestras con DPX. La reacción de la 3-3'-diaminobenzidina con la peroxidasa unida al anticuerpo secundario produce un color marrón que indica la presencia de iNOS o nitrotirosina en el tejido.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 40°C en el dispositivo de automatización Microprobe de Biomedica Corp., Foster City, CA, U.S.A. Entre los distintos pasos los cortes se lavaron con tampón salino de fosfatos (PBS), pH 7.4.

Los controles negativos de los tejidos estudiados se realizaron omitiendo en el procedimiento anterior la incubación con el anticuerpo primario (anti-iNOS o anti-nitrotirosina).

2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.4.1 Estudio de la modulación nitrérgica en la secreción pancreática

Los siguientes experimentos se realizaron con el objetivo de identificar e individualizar los efectos del óxido nítrico sobre la secreción pancreática exocrina en función del isoenzima (neural, endotelial o inducible) responsable de su producción. Para ello, grupos independientes de ratas fueron tratados con diferentes fármacos que poseen una acción conocida sobre la actividad enzimática de la NOS o sobre la propia molécula de óxido nítrico y su efecto sobre la secreción pancreática se evaluó en condiciones basales o tras estimulación con ceruleína.

2.4.1.1 INHIBICIÓN DE LA NOS TOTAL

Para bloquear de forma inespecífica y universal la actividad enzimática de la NOS se utilizó **L-NAME** (*N^G*-nitro-L-arginin metil ester).

Este inhibidor se administró 2 minutos antes del tiempo 0 del experimento, a dosis de 30 mg/kg, en forma de bolus e.v., y su efecto sobre la secreción pancreática no estimulada se evaluó durante los 40 minutos siguientes.

Es conocido que la acción inhibidora de L-NAME sobre la NOS neural se manifiesta de forma completa transcurridos 15 minutos desde su administración [Moore PK, 1991]. Basado en este hecho, se realizó una segunda serie de experimentos dirigidos a investigar la participación de la NOS neural en la secreción pancreática. Para ello se analizó la secreción pancreática estimulada mediante dosis supramáximas de ceruleína (10 g/kg, i.v en el tiempo 0) en dos series independientes de experimentos realizadas a diferentes tiempos: **25 minutos** después de la administración L-NAME (30 mg/kg, i.v.), período adecuado para conseguir la inhibición completa de la NOS endotelial y neural, y a los **2 minutos** de infundir la misma dosis de L-NAME, tiempo adecuado para

inhibir la NOS endotelial, pero insuficiente para lograr el bloqueo de la isoenzima neural.

2.4.1.2 INHIBICIÓN DE LA NOS NEURAL

Como inhibidor selectivo *in vivo* de la NOS neural se administró el compuesto heterocíclico **indazol**. Para su administración se preparó una solución compuesta de una parte de etanol puro y cinco partes de aceite de cacahuete (vol/vol), en un volumen máximo de 1 ml.

En una primera serie de experimentos se administró una dosis de indazol (100 mg/kg, i.p.) o de excipiente (alcohol más aceite de cacahuete) 2 minutos antes del tiempo 0 y se analizó su efecto sobre la secreción pancreática no estimulada.

Para estudiar el efecto de la inhibición de la NOS neural sobre la secreción pancreática estimulada se establecieron otros dos protocolos de tratamiento. En uno de ellos las ratas recibieron 2 dosis iguales de indazol (50 mg/kg, i.p.) 50 minutos y 5 minutos antes del tiempo 0. En grupos independientes de ratas pretratadas se estudió el efecto del indazol en la secreción pancreática en respuesta a la estimulación con diferentes dosis de ceruleína: 0.1, 0.25, 1, 10 o 50 g/kg (bolus i.v en el tiempo 0). En el segundo grupo de tratamiento se administró indazol (100 mg/kg, i.p.) o excipiente 2 minutos antes de la estimulación pancreática con dosis supramáximas de ceruleína (10 µg/kg, i.v., tiempo 0).

2.4.1.3 ABLACIÓN SENSORIAL DE FIBRAS NEURALES AFERENTES

Esta serie de experimentos se diseñó para investigar el efecto de la destrucción funcional de las fibras nerviosas capsaicin sensibles sobre la secreción pancreática estimulada en respuesta a dosis supramáximas de ceruleína (10g/kg, i.v). Las ratas fueron pretratadas con capsaicina de forma sistémica o local 5 días antes de evaluar la respuesta secretora del páncreas.

La capsaicina en solución al 0.5 y 1% (peso:vol) se preparó mediante disolución

en 10% de etanol absoluto, 10% de Tween 80 y 80% de suero fisiológico (vol/vol/vol).

Administración sistémica de capsaicina. En ratas anestesiadas superficialmente con éter se inyectó por vía subcutánea 3 dosis de 50 mg/kg de capsaicina en los días 5, 4 y 3 previos al estudio de secreción pancreática. Mediante este esquema de tratamiento con capsaicina se logra la desfuncionalización de las fibras aferentes sensoriales primarias [Martling CR, 1987]. Los animales fueron pretratados con terbutalina (0.1 mg/kg, i.m) y aminofilina (10 mg/kg, i.m) antes de las inyecciones de capsaicina con el objeto de prevenir el desarrollo de distres respiratorio agudo. La efectividad del tratamiento con capsaicina se verificó el día antes de los experimentos de secreción mediante el test del parpadeo [Girolomoni, 1990], que consiste en detectar la alteración quimiosensitiva tras la instilación intraocular de una gota de capsaicina al 0.1% en etanol:suero fisiológico (vol:vol, 1:1). Esta prueba demuestra la efectividad del tratamiento cuando existe una reducción de la frecuencia de parpadeo superior al 80% respecto a las ratas no tratadas con capsaicina

Administración local de capsaicina. Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (100 mg/kg, i.p.) y pretratadas con terbutalina y aminofilina del mismo modo que en el grupo de capsaicina sistémica. Se practicó laparotomía media, se identificaron ambos troncos vagales a nivel supradiafragmático y se disecaron de estructuras adyacentes para permitir la colocación alrededor de ambos nervios de una torunda de gasa empapada en 100 µl de capsaicina al 0.1%. Al mismo tiempo, para desfuncionalizar las vías enteropancreáticas capsaicin sensibles, se hizo avanzar hasta duodeno una gasa empapada con 200 µl de capsaicina al 0.5%. A los 30 minutos se retiraron las torundas (perivagales e intraduodenales), se realizó limpieza de las zonas manipuladas con suero fisiológico y se suturaron estómago e incisión abdominal. Los experimentos de secreción pancreática fueron realizados 5 días después.

2.4.1.4 INHIBICIÓN DE LA NOS INDUCIBLE

Para lograr la inhibición selectiva del isoenzima inducible de la NOS se utilizó **aminoguanidina**. Los resultados obtenidos sirvieron como control de la inhibición de la NOS constitutiva (endotelial y/o neural). La aminoguanidina se disolvió en suero fisiológico en una concentración 0.4 M y se administró 60 minutos antes del tiempo 0 a una dosis de 40 mg/kg, e.v.

2.4.1.5 SUSTRACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO CIRCULANTE

Con el objetivo de retirar el óxido nítrico que circula en el torrente sanguíneo se diseñó una serie de experimentos en los que las ratas fueron tratadas con **hemoglobina reducida**. Siguiendo el método descrito por Martin y col. [Martin, 1985], se preparó en agua destilada una solución 1 mM de hemoglobina y a ésta se añadió un exceso 10 M del agente reductor ditionito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).

Transcurrido el tiempo necesario para la reducción completa de la hemoglobina (15 minutos), el ditionito sódico fue eliminado mediante diálisis en membrana de celofán (8/31, 6.3 mm de diámetro; Medicell Int. Ltd., Londres, Reino Unido) contra 100 volúmenes de suero fisiológico, en sistema giratorio continuo, a 4°C, durante 2 horas. La solución obtenida fue alicuotada y congelada a -80°C hasta su utilización.

En el tiempo 0, previo acondicionamiento de la hemoglobina a 37°C, se administró por el catéter venoso un dosis de 500 mg/kg en un volumen de 1 ml en forma de bolus e.v., seguido de la perfusión durante 2 minutos de la misma dosis en 1 ml (total: 1 g/kg de hemoglobina reducida en un volumen de 2 ml). Con el fin de no originar cambios agudos de volumen intravascular, previamente a la infusión de hemoglobina se extrajeron 2 ml de sangre por el catéter carotídeo. La presión arterial fue monitorizada durante todo el experimento y la secreción pancreática recogida en fracciones de 10 minutos como se ha descrito previamente.

En experimentos independientes se estudió la secreción pancreática no estimulada tras la administración de hemoglobina y la secreción pancreática estimulada con

ceruleína (10 µg/kg, i.v.) administrada a los dos minutos de finalizar la infusión de hemoglobina.

Para excluir el efecto derivado de un aumento de la presión oncótica que la hemoglobina pudiese generar, se realizó otra serie de experimentos en los que las ratas recibieron una cantidad de **albúmina** con una capacidad oncótica equivalente a la de la hemoglobina infundida [Thompson, 1994]. Siguiendo el diseño anterior, se administraron 2 ml (971 mg/kg) de una solución de albúmina al 14.56%, bajo control continuo de la tensión arterial y cuantificación del débito de amilasas durante los 40 minutos posteriores a la infusión.

2.4.2 Estudio de la inhibición de la NOS neural en la pancreatitis aguda edematosa

Esta serie de experimentos constituye una extensión de estudios realizados previamente por Molero y col. sobre el efecto del óxido nítrico en la pancreatitis aguda edematosa en ratas, cuyos resultados ponen de manifiesto un empeoramiento del proceso inflamatorio local (mayor amilasemia e infiltración leucocitaria en páncreas) cuando éstas son tratadas con L-NAME y una mejoría histológica cuando reciben tratamiento con nitroprusiato sódico [Molero, 1995].

Dado que el L-NAME es un inhibidor de los tres isoenzimas de la NOS se diseñó el siguiente estudio dirigido a investigar la participación del isoenzima neural de NOS en este modelo de pancreatitis. Para responder a esta cuestión se practicó una inhibición selectiva de la isoenzima neural de la NOS mediante la administración de **indazol**. Para su aplicación éste se solubilizó al 1.5% mediante sonicación y calentamiento en carbonato sódico al 0.5% y etanol puro (vol:vol, 1:1), pH 7.4.

La pancreatitis aguda se indujo en ratas anestesiadas con ketamina mediante la inyección i.p. de 4 dosis de ceruleína (20 µg/kg) a intervalos de 1 hora. El indazol se administró 30 minutos antes de iniciar la inducción (50 mg/kg, i.p.) y a intervalos de una hora (10 mg/kg, i.m.) con el fin de mantener la inhibición enzimática de la NOS neural. En el grupo control se administró, según el esquema

anterior, tratamiento con ceruleína y el excipiente del indazol.

A las 9 horas de la primera inyección de ceruleína, previa extracción de sangre mediante punción cardíaca con jeringa heparinizada, las ratas se mataron por dislocación cervical. Se resecó el páncreas a través de incisura abdominal longitudinal, disecándolo de la grasa y de estructuras ganglionares adyacentes, y se dividió en dos piezas. Unas se congelaron inmediatamente tras su extracción en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta ser procesadas para cuantificación de la actividad mieloperoxidasa (parámetro que refleja el grado de infiltración leucocitaria tisular). En los otros fragmentos de páncreas se determinó el edema pancreático. Para ello se obtuvo el peso en fresco de la pieza y el peso tras su desecación en estufa a 160°C durante 24 horas. El contenido líquido tisular se calculó como porcentaje del peso fresco del páncreas.

La sangre extraída se centrifugó a 1400 g durante 10 minutos y del plasma obtenido se hicieron diluciones 1:2000 para análisis de la actividad de amilasas.

2.4.2 Estudio de la implicación del óxido nítrico en la pancreatitis aguda

2.4.3.1 RELACION DEL NO CON LA GRAVEDAD DE LA PANCREATITIS AGUDA

La pancreatitis aguda fue inducida en dos modelos experimentales de diferente gravedad con el fin de investigar la implicación del óxido nítrico en la severidad de la lesión pancreática. Se establecieron 3 grupos de estudio, cada uno de ellos compuesto por un número de 6 a 8 ratas, que fueron:

- A) Grupo de **páncreas normal**. Ratas que no recibieron tratamiento alguno.
- B) Grupo de **pancreatitis edematosa**. Ratas tratadas con dos dosis supramáximas de ceruleína ($20\text{ }\mu\text{g/kg}$ en un volumen de $400\text{ }\mu\text{l}$, i.p.) en un intervalo de 1 hora.
- C) Grupo de **pancreatitis necrohemorrágica**. Ratas a las que se aplicó $400\text{ }\mu\text{l}$ de taurocolato sódico al 4% intraductal.

Transcurridas 6 horas desde la primera inyección de ceruleína o desde la aplicación intraductal de taurocolato sódico se obtuvo sangre mediante punción cardíaca con jeringa heparinizada y se mataron los animales para extracción del páncreas y posterior estudio histológico o bioquímico.

La sangre extraída se centrifugó a $\times 1400\text{ g}$ y en el plasma resultante se determinaron los siguientes parámetros:

✓ Actividad de AMILASAS

✓ Concentración de NITRITOS/NITRATOS

El páncreas obtenido se dividió en varias piezas que fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C (a) o fijadas en formaldehído al 10% (b) para realizar las siguientes determinaciones:

(a) ✓ Actividad MIELOPEROXIDASA

✓ Concentración de PEPTIDOS DE ACTIVACION DEL TRIPSINOGENO (TAP)

(b) ✓ ESTUDIO HISTOLOGICO

✓ ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO para detección de nitrotirosina y de la NOS inducible

2.4.3.2 CONSECUENCIAS DE LA INHIBICION DE LA NOS INDUCIBLE

Con el objetivo de investigar el efecto de la inhibición de la NOS inducible sobre el grado de lesión pancreática en la pancreatitis aguda, se repitió el mismo protocolo de trabajo anterior en ratas pretratadas con aminoguanidina. Este inhibidor selectivo de la NOS inducible se administró por vía i.p. en tres dosis de 100 mg/kg/día , los dos días previos y una hora antes de inducir la pancreatitis aguda. Experimentos previos han mostrado la efectividad de este régimen de tratamiento en la inhibición total de la isoenzima inducible de la NOS. La aminoguanidina fue preparada en fresco antes de su administración mediante

disolución en suero fisiológico a una concentración 0.4 M.

Los estudios bioquímicos e histológicos fueron los mismos que los realizados en los grupos no tratados con aminoguanidina, y los resultados obtenidos fueron comparados con los del correspondiente grupo de pancreatitis no pretratado.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los resultados se expresan como media $\pm$ error estandar de la media (media $\pm$ EE).

La comparación entre los parámetros de dos grupos se realizó mediante la prueba "*t* de Student" para datos no pareados.

Cuando se evaluaron diferencias entre más de dos grupos de animales se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para datos no pareados seguido de corrección de Fisher.

Para el análisis de la actividad mieloperoxidasa tisular entre diferentes grupos de pancreatitis se realizó transformación logarítmica de los datos con el fin de evitar la diferente dispersión de los datos observados que comporta una actividad enzimática en reposo o tras su activación.

La correlación entre dos variables se realizó mediante análisis de regresión.

Las curvas de secreción enzimática no estimulada obtenidas en respuesta a la administración de diferentes fármacos se compararon mediante el análisis de la varianza para mediciones repetidas seguido de corrección de Fisher.

El nivel de significación estadística se consideró en el 5% ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS

3.1 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL NO SOBRE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA

3.1.1 Patrón normal de secreción. Estimulación con ceruleína

La secreción pancreática no estimulada fue de 343 ± 44 U de amilasas/40 minutos. La estimulación hormonal del páncreas con dosis óptimas de ceruleína (0.1 y 0.25 $\mu\text{g/kg}$) indujo una respuesta máxima de la secreción exocrina, aumentando el débito de amilasas a 2355 ± 320 y 3998 ± 300 U/40 min, respectivamente. La administración de dosis superiores a 0.25 $\mu\text{g/kg}$ (dosis supramáximas) resultó en la obtención de una curva decreciente de secreción, de manera que con niveles de 10 y 50 $\mu\text{g/kg}$ de ceruleína el débito de amilasas se redujo a valores equiparables a los de la secreción no estimulada (225 ± 26 y 150 ± 70 U/40 min, respectivamente) (figura 1).

La curva dosis-respuesta obtenida mediante la estimulación con dosis crecientes de ceruleína es un aspecto conocido de la secreción pancreática, como así lo demuestran estudios fisiológicos realizados en acinis dispersos [Jensen, 1994], páncreas de rata aislado [Otsuki M. 1979] y en ratas *in vivo* [Niederau M, 1989; Nagain, 1991].

3.1.2 Inhibición del NO

3.1.2.1 EFECTOS SOBRE LA TENSIÓN ARTERIAL

La presión media arterial (PMA) observada en condiciones basales fue de 113 ± 2 mmHg. Con el fin de evitar la variabilidad de PMA basal existente entre las ratas, los cambios de presión experimentados tras la administración de diferentes fármacos se expresan como incremento en mm Hg respecto a su propia PMA basal. Como incremento de presión se consideró la diferencia entre la cifra máxima de PMA registrada y la PMA basal. Datos representados en la figura 2.

La infusión e.v. de **hemoglobina reducida** ocasionó un aumento rápido y marcado de la PMA (60 ± 3 mm Hg sobre el valor basal, media $\pm$ EE). Este efecto fue reversible, retornando de nuevo la PMA a cifras basales en un tiempo medio de 11 ± 0.5 minutos (media $\pm$ EE).

Del mismo modo, la administración de **ceruleína a dosis supramáximas** de $10 \mu\text{g/kg}$ produjo un marcado y brusco incremento de la PMA basal (60 ± 4 mm Hg), comparable al inducido por la hemoglobina reducida, aunque de menor duración (5.25 ± 0.5 minutos). Contrariamente, cuando se utilizaron **dosis subóptimas de ceruleína** ($0.1 \mu\text{g/kg}$) la PMA basal experimentó una pequeña, aunque significativa, reducción (-7.5 ± 1.9 mm Hg, $p < 0.05$ respecto a los demás grupos de tratamiento) de carácter transitorio (5 ± 0.7 minutos).

El efecto de **L-NAME** sobre la PMA se caracterizó por alcanzar un valor 1.8 veces superior al basal (85.5 ± 9 mm Hg), siguiéndose de un descenso lento y parcial hasta un valor de 1.6 de la PMA basal al final del período de observación de 40 minutos. El incremento de presión originado por L-NAME fue significativamente superior al desarrollado tras la administración aislada de hemoglobina reducida o de $10 \mu\text{g/kg}$ de ceruleína ($p < 0.05$). Por el contrario, la **combinación de hemoglobina y dosis supramáximas de ceruleína** intensificó el aumento de la PMA obtenido por ambos fármacos por separado (74 ± 5 mm Hg, $p < 0.05$ respecto a hemoglobina sola y a ceruleína $10 \mu\text{g/kg}$ sola) e igualó el incremento producido por L-NAME ($p > 0.05$).

La administración i.p. de **indazol** no modificó las cifras de la PMA durante el período de observación (incremento de 1.2 ± 1 mm Hg).

El tratamiento con **albúmina** en una cantidad isooncótica a la de la hemoglobina utilizada causó un incremento de 14.7 ± 4 mm Hg, efecto que fue de menor intensidad ($p < 0.05$) y menor duración (6.25 ± 0.25 minutos) que el generado por la hemoglobina o L-NAME.

3.1.2.2 EFECTOS SOBRE LA SECRECIÓN NO ESTIMULADA

La secreción basal de cada rata se consideró como valor 100%. El efecto de los diferentes fármacos sobre la secreción pancreática no estimulada ha sido expresado como el porcentaje de variación (incremento o disminución) del débito de amilasas (unidades de actividad enzimática) durante 40 minutos respecto al propio valor de secreción basal. Esta estandarización de resultados pretende evitar las fluctuaciones de secreción que tienen lugar de forma cíclica. Los valores están individualizados en períodos de 10 minutos y se hallan representados en la figura 3.

El grupo control, que recibió 200 μ l de suero fisiológico en el tiempo 0, experimentó un ligero aumento del débito de amilasas recogido en 40 minutos (101.7 ± 7.7 % del valor basal)

Tanto **L-NAME** (infundido 2 minutos antes de iniciar la recogida de la secreción) como la sustracción del NO circulante con **hemoglobina** redujeron el débito de amilasas en los 40 minutos posteriores a su administración al 78.7 ± 9.2 % y 65.5 ± 7.2 %, respectivamente, del valor basal ($p < 0.05$ respecto al grupo control).

En contraste, tras la administración de **albúmina** en una cantidad isooncótica a la de la hemoglobina utilizada, no se observó reducción de la secreción sino que, por el contrario, se obtuvo un pequeño aunque significativo aumento del débito enzimático (118.2 ± 8.7 %, $p < 0.05$ respecto al grupo control y a los demás grupos de tratamiento).

La inhibición de la NOS neural con **indazol** resultó en una importante reducción del débito de amilasas durante 40 minutos (43.7 ± 9.2 %, $p < 0.05$ respecto al grupo control y a los demás grupos de tratamiento).

Cuando las ratas recibieron **capasaicina sistémica** con el fin de inhibir la NOS neural el débito basal de amilasas se redujo un 45% (47.4 ± 8 vs 85.8 ± 11 U/10 min, $p < 0.05$), de forma equiparable al efecto de indazol (42.5 ± 7 U/10 min, $p > 0.05$ respecto a capsaicina). Dado que la secreción basal (media de dos períodos de 10 minutos) obtenido a los 5 días de aplicar la capsaicina es un valor estable, únicamente se compara este período y no el de 40 minutos .

La inhibición selectiva de la iNOS con **aminoguanidina** no modificó el débito basal de amilasas (74.8 ± 20 U/10 min, $p < 0.05$ respecto a la secreción basal).

3.1.2.3 EFECTOS SOBRE LA SECRECIÓN ESTIMULADA

Inhibición de la NOS neural

INDAZOL (Figura 4). La administración aislada de indazol redujo significativamente la secreción de amilasas recogida durante 40 minutos en comparación con la observada en ratas no tratadas. El efecto de indazol sobre la curva de secreción en respuesta a dosis crecientes de ceruleína mostró un desplazamiento hacia la derecha de la respuesta secretora a la estimulación hormonal. Con dosis subóptimas ($0.1 \mu\text{g/kg}$) y óptimas ($0.25 \mu\text{g/kg}$) de ceruleína la secreción no se vio modificada en las ratas pretratadas con indazol. Sin embargo, el efecto inhibitorio causado por dosis supramáximas de ceruleína ($10 \mu\text{g/kg}$) sobre la secreción enzimática fue parcialmente revertido en las ratas que recibieron indazol. Cuando la dosis de ceruleína se incrementó a $50 \mu\text{g/kg}$, indazol contrarrestó también de forma significativa la inhibición de la secreción aunque en menor grado que el ocasionado con $10 \mu\text{g/kg}$ de ceruleína. Este hecho sugiere que la inhibición de la NOS neural provoca un aumento del umbral inhibitorio generado por altas dosis de ceruleína, es decir, una desensibilización de las vías inhibitorias de la secreción activadas por la estimulación hormonal supramáxima.

El efecto del indazol sobre la secreción estimulada no varió cuando éste se aplicó 50 minutos o 2 minutos antes de la administración de ceruleína.

CAPSAICINA (Figura 5). La ablación sensorial de las fibras nerviosas sensitivas reprodujo el efecto observado en las ratas tratadas con indazol, de forma que la aplicación local o sistémica de **capsaicina** contrarrestó el efecto inhibitorio sobre la producción de amilasas generado por dosis supramáximas ($10 \mu\text{g/kg}$) de ceruleína (1023 ± 200 U/40 min frente a ceruleína sola 260 ± 43 U/40 min, $p < 0.05$).

L-NAME (Figura 5). La administración de L-NAME 2 minutos antes de la estimulación pancreática con dosis supramáximas de ceruleína (10 µg/kg) intensificó la inhibición de la secreción de amilasas (85 ± 16 U/40 min frente a ceruleína sola 260 ± 43 U/40 min, $p < 0,05$). Contrariamente, la aplicación de L-NAME 25 minutos antes de la estimulación con 10 µg/kg de ceruleína produjo una respuesta paradójica contrarrestando, al igual que se observó con indazol o con capsaicina, el efecto inhibitorio inducido por dosis altas de ceruleína (1730 ± 150 U/40 min, $P < 0.05$ respecto a ceruleína sola) (Figura 6). Esta respuesta paradójica se obtiene una vez transcurrido el tiempo suficiente (25 minutos) para inhibir de forma completa la NOS neural por parte de L-NAME. Ello contrasta con la marcada reducción de la secreción cuando sólo se inhibe la NOS endotelial al co-administrar L-NAME y ceruleína.

Sustracción del NO circulante

La infusión de hemoglobina reducida reprodujo la respuesta observada con L-NAME administrado 2 minutos antes de la estimulación con 10 µg/kg de ceruleína. Es decir, la hemoglobina, además de reducir la secreción no estimulada de amilasas, potenció la inhibición de la secreción de amilasas en respuesta a la estimulación hormonal supramáxima (116 ± 16 U/40 min frente a ceruleína sola 343 ± 44 U/40 min, $p < 0.05$) (Figura 5).

3.2 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA NOS NEURAL SOBRE LA PANCREATITIS AGUDA INDUCIDA POR CERULEÍNA

La administración repetida de dosis supramáximas de ceruleína indujo el desarrollo de los cambios histológicos y bioquímicos característicos de pancreatitis aguda edematosa, observándose a las nueve horas de evolución un significativo aumento de la actividad plasmática de amilasas, importante edema pancreático y formación de infiltrado agudo leucocitario en páncreas (Tabla 1). La administración de indazol no modificó los niveles de actividad de amilasas en plasma ni el grado de edema pancreático, ambos parámetros considerados indicadores de gravedad de la

pancreatitis. No obstante, la actividad mieloperoxidasa en páncreas fue significativamente menor a la observada en el grupo que recibió únicamente ceruleína. Esta observación refleja una reducción de la inflamación tisular local en la pancreatitis aguda cuando la NOS neural se halla inhibida.

Tabla 1. Efecto del tratamiento con indazol sobre la gravedad de la pancreatitis aguda por ceruleína. (n = 5). * p > 0.05 respecto al grupo control, # p < 0.05 respecto al grupo de ceruleína. Análisis de la Varianza.

	Pancreatitis aguda control	Pancreatitis aguda + indazol
Amilasa plasmática (U/ml)	32.2 ± 3.6	28.2 ± 2.6
Edema pancreático (%)	81.3 ± 0.9	82 ± 1.1
MPO (mU/mg proteína)	1300 ± 148	793 ± 115

3.3 IMPLICACIÓN DEL NO EN LA PANCREATITIS AGUDA

3.3.1 Estudio de la intervención del NO en la gravedad de la pancreatitis aguda

EXAMEN HISTOLÓGICO

La inspección macroscópica y el estudio microscópico se realizó en páncreas extraídos a las 6 horas de iniciar la inducción de la pancreatitis aguda.

En las ratas sometidas a estimulación supramáxima con ceruleína, la inspección macroscópica de los páncreas reveló intenso edema glandular, en ausencia de hemorragias y escasa ascitis. Los hallazgos histológicos más destacados fueron la

presencia de marcado edema intersticial, infiltración difusa de granulocitos en espacio intersticial, y en menor grado vacuolización y necrosis focal de células acinares. No se detectaron hemorragias ni esteatonecrosis.

El grupo de ratas tratado con taurocolotao intraductal desarrolló pancreatitis necrohemorrágica con severa afectación macroscópica y microscópica en cabeza pancreática, consistente en edema, hemorragias intersticiales, necrosis de lobulillos completa, esteatonecrosis y abundante ascitis serohemática. En el examen histológico destacó intenso infiltrado inflamatorio granulocitario en espacio intersticial acompañando a las demás lesiones descritas. La afectación de cola de páncreas fue menor o inaparente, pudiéndose observar cierto grado de edema y hemorragias focales ocasionales.

DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE iNOS Y NITROTIROSINA

En los páncreas normales las tinciones inmunohistoquímicas fueron negativas tanto para la detección de iNOS como de nitrotirosina.

En el grupo de pancreatitis edematosa, la inmunotinción con anticuerpo anti-iNOS demostró una amplia distribución del isoenzima en el páncreas. La expresión de la iNOS en estos tejidos se localizó preferentemente en células acinares, especialmente en las zonas de mayor lesión, así como en los neutrófilos presentes en el intersticio. En menor medida se observó positividad débil en algunos Islotes de Langerhans y ocasionalmente en endotelio vascular, nervios y en células mononucleares de ganglios linfáticos regionales. Contrariamente, a pesar de la abundante expresión de la iNOS en estos tejidos, la tinción con anticuerpo antinitrotirosina fue negativa.

En la pancreatitis necrohemorrágica la presencia de iNOS en el páncreas fue también muy marcada, y su distribución e intensidad fue similar a la observada en la pancreatitis edematosa. Paralelamente, la inmunotinción para nitrotirosina detectó una extensa localización de este aminoácido nitrado, afectando especialmente células acinares. La tinción para iNOS y nitrotirosina se localizó en

las mismas áreas de lesión pancreática, lo que sugiere que los peroxinitritos son formados en lugares adyacentes a la expresión de la iNOS y pueden contribuir a la lesión tisular.

INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA EN PÁNCREAS

La actividad enzimática de la mieloperoxidasa en tejido pancreático fue significativamente superior en la pancreatitis edematosa en comparación con la observada en el grupo de páncreas normal (224 ± 28 vs 53 ± 8 mU/mg proteína respectivamente; $p < 0.05$). Este aumento fue aún mayor en la pancreatitis necrohemorrágica (930 ± 125 mU/mg proteína; $p < 0.05$ respecto a la pancreatitis edematosa y páncreas normal) (Figura 7).

PEPTIDOS DE ACTIVACION DEL TRIPSINÓGENO (TAP) EN PÁNCREAS

En el grupo control se detectó una pequeña cantidad de TAP (0.59 ± 23 nmol/100 mg proteínas) derivada de la autoactivación fisiológica del tripsinógeno. En la pancreatitis edematosa, la concentración pancreática de TAP aumentó, aunque no de forma significativa, respecto al grupo control (1.37 ± 0.2 , $p > 0.05$). La pancreatitis necrohemorrágica se asoció a un importante incremento de este marcador de necrosis acinar (1.37 ± 0.2 , $p < 0.05$ respecto al grupo de páncreas normal y al de pancreatitis edematosa) (Figura 8).

NITRITOS/NITRATOS (NOx) EN PLASMA

La concentración basal de NOx en plasma detectada en el grupo de páncreas normal (17 ± 1.5 μ M) aumentó de forma significativa en la pancreatitis edematosa (24.5 ± 1.5 μ M, $p < 0.05$ respecto al grupo de páncreas normal). En la pancreatitis necrohemorrágica este incremento fue mucho mayor (35 ± 2.8 μ M, $p < 0.05$ respecto a los dos grupos restantes) (Figura 9).

RELACION ENTRE INFILTRACION LEUCOCITARIA Y TAP

Para estudiar la relación existente entre marcadores de gravedad en la pancreatitis aguda se estudió la correlación entre todos los valores de MPO obtenidos en ambas variedades de pancreatitis con los correspondientes valores de TAP. El análisis lineal de regresión entre ambas variables mostró un alto índice de correlación ($r = 0.76$) y valor de probabilidad ($p = 0.02$) entre el aumento de TAP y el incremento de MPO en tejido pancreático (Figura 10).

RELACION ENTRE INFILTRACION LEUCOCITARIA Y NIVELES PLASMÁTICOS DE NO

La correlación entre los valores de MPO hallados en la pancreatitis aguda y sus respectivos niveles de nitritos/nitratos en sangre fue muy elevada ($r = 0.76$; $p = 0.006$) (Figura 10).

3.3.2 Consecuencias de la inhibición de la NOS inducible

EXAMEN HISTOLÓGICO

El tratamiento con aminoguanidina no modificó las características ni la intensidad de las lesiones descritas en la pancreatitis edematosa ni en la necrohemorrágica. Únicamente destaca la existencia de un menor grado de infiltración leucocitaria en la forma necrohemorrágica pretratada con aminoguanidina respecto a su grupo control.

DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE iNOS Y NITROTIROSINA

La administración de aminoguanidina previa a la inducción de pancreatitis edematosa no inhibió la expresión de la iNOS en el páncreas. La inmunotinción con anticuerpo anti-iNOS detectó la presencia del isoenzima en una cantidad y distribución similar a la observada en la pancreatitis edematosa no pretratada. La detección de nitrotirosina fue, al igual que en el grupo no pretratado, negativa.

En la pancreatitis necrohemorrágica el pretratamiento con aminoguanidina tampoco modificó la expresión de iNOS en el páncreas respecto a su grupo control, hallando una distribución e intensidad de la tinción similar en ambos grupos. No obstante, un hallazgo de gran interés fue la ausencia total de nitrotirosina, en contraste con la abundante formación en los páncreas de ratas no pretratadas con aminoguanidina.

El estudio inmunohistoquímico únicamente informa sobre la expresión de la proteína, no así de la actividad de la misma. Las observaciones recogidas en estos estudios ponen de la reconocida acción inhibidora de la aminoguanidina sobre la actividad de la iNOS. Este efecto inhibitorio es llevado a cabo a nivel del propio enzima sin afectar su expresión.

ACTIVIDAD DE AMILASAS EN PLASMA

La hiperamilasemia detectada en la pancreatitis edematosa fue aún mayor en las ratas que recibieron tratamiento con aminoguanidina (37.300 ± 4.910 frente a 19.628 ± 3.270 U/L, $p < 0.01$). En la pancreatitis necrohemorrágica, las ratas pretratadas con aminoguanidina también presentaron un aumento de la actividad plasmática de amilasa respecto a su grupo control (17.333 ± 3.138 frente a 11.800 ± 1182 U/L, $p > 0.05$) aunque no llegó a la significación estadística. En el grupo de páncreas normal la aminoguanidina no modificó el nivel de amilasas en plasma (1.266 ± 156 frente a 1.350 ± 231 U/L, $p > 0.05$) (Figura 11).

INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA EN PÁNCREAS

La administración de aminoguanidina se asoció a una significativa reducción del aumento de actividad mieloperoxidasa originado en la pancreatitis edematosa (89.3 ± 7.7 frente a 226 ± 28.8 mU /mg proteína, $p < 0.05$) y en la necrohemorrágica (364.3 ± 99.7 frente a 930 ± 125 mU /mg proteína, $p < 0.05$). En el grupo de páncreas normal la actividad mieloperoxidasa fue similar en ambos grupos (59 ± 7 frente a 52.3 ± 8.8 mU/mg proteína) (Figura 12).

PEPTIDOS DE ACTIVACION DEL TRIPSINÓGENO (TAP) EN PANCREAS

El pretratamiento con aminoguanidina potenció el incremento en la concentración pancreática de TAP observado en la pancreatitis aguda, tanto en la forma edematosa (3.34 ± 0.14 frente a 1.37 ± 0.2 nmol/100 mg proteínas, $p = 0.0001$) como en la necrohemorrágica (5.43 ± 0.51 frente a 3.78 ± 0.43 nmol/100 mg proteínas, $p < 0.05$). La aminoguanidina no afectó la cifra basal de TAP en el grupo de páncreas normal (0.48 ± 0.27 frente a 0.59 ± 0.23 nmol/100 mg proteínas, $p < 0.05$) (Figura 13).

NITRITOS/NITRATOS (NOx) EN PLASMA

El pretratamiento con aminoguanidina en la pancreatitis edematosa redujo el nivel de NOx en plasma respecto a su grupo control (18.1 ± 1.7 frente a 24.5 ± 2.2 μM , $p < 0.05$), alcanzando concentraciones similares al valor basal (17 ± 1.5 μM , $p < 0.05$). En la pancreatitis necrohemorrágica, las rats tratadas con aminoguanidina mostraron una menor concentración plasmática de NOx respecto a su grupo control (27.2 ± 1.8 μM frente a 35 ± 2.8 μM), aunque el nivel de NOx no se redujo hasta el valor basal (Figura 14).

RELACION ENTRE INFILTRACION LEUCOCITARIA Y TAP

En las ratas pretratadas con aminoguanidina, la relación entre actividad MPO y concentración de TAP en páncreas mostró una pobre correlación ($r = 0.52$; $p = 0.04$), a diferencia de lo observado en la pancreatitis aguda no tratada con aminoguanidina. Ello refleja el hecho de que a pesar de que la aminoguanidina disminuye la infiltración inflamatoria en páncreas el grado de lesión pancreática aumenta (Figura 15).

RELACION ENTRE INFILTRACION LEUCOCITARIA Y NIVELES PLASMÁTICOS DE NO

Cuando las ratas recibieron tratamiento con aminoguanidina, la alta correlación observada en la pancreatitis aguda entre actividad MPO pancreática y concentración

de nitritos/nitratos en sangre fue mucho menor ($r = 0.47$; $p = 0.12$). Ello responde a la disminución de la infiltración leucocitaria en páncreas causada al inhibir selectivamente la actividad iNOS con aminoguanidina (Figura 15).

III. DISCUSION

El propósito de los estudios sobre secreción pancreática que componen la primera parte de este trabajo fue individualizar los efectos de la NOS sobre la secreción enzimática del páncreas según la isoenzima afectada. Para ello diseñamos una serie de experimentos dirigidos a estudiar el patrón de secreción exocrina del páncreas bajo diferentes condiciones de manipulación farmacológica de la NOS o del NO. Como criterio funcional de respuesta secretora establecimos la producción de amilasas recogidas en jugo biliopancreático durante un período determinado de tiempo (unidades/10 o 40 minutos).

Para inhibir la actividad de la NOS neural utilizamos el indazol. Este compuesto y otros imidazoles derivados, como el 7-nitroindazol, han mostrado *in vivo* una capacidad para inhibir de forma selectiva la isoenzima neural de la NOS [Babbedge, 1993; Moore, 1993a]. Este compuesto no presenta ningún efecto sobre la NOS endotelial, lo cual se refleja en el hecho de que su administración *in vivo*, a diferencia de lo observado con L-NAME, no genera aumento de la tensión arterial [Moore, 1993b; Kajekar, 1995]. De acuerdo con estas observaciones, el tratamiento con indazol tampoco modificó en nuestros experimentos las cifras de tensión arterial durante los 60 minutos posteriores a su aplicación.

En contraste, sobre la secreción enzimática el bloqueo de la neurotransmisión nitrérgica inducido por indazol ocasionó una reducción del débito basal de amilasas. Según el diseño de nuestros experimentos sobre secreción pancreática, el jugo biliopancreático es derivado fuera de la luz duodenal durante 50 minutos antes de la administración de fármacos (30 minutos de estabilización seguido de dos períodos de 10 minutos para calcular la secreción basal). Es conocido que la derivación del jugo biliopancreático da lugar a un marcado incremento de la secreción proteica, que llega a un nivel máximo durante las dos primeras horas y disminuye gradualmente en las horas posteriores. A su vez, los niveles plasmáticos de CCK experimentan cambios paralelos a los de la producción pancreática de proteínas, lo cual sugiere que la CCK es la responsable de las variaciones de secreción ocurridas en estas condiciones [Li, 1995]. Hecha esta

consideración, interpretamos que la secreción basal obtenida en nuestros experimentos es el resultado de la estimulación inducida por concentraciones picomolares (fisiológicas) de CCK endógena. La disminución de los niveles de secreción basal obtenidos tras la administración de indazol es equiparable a observaciones realizadas por Li y col.. Estos autores demuestran que el aumento de la secreción basal pancreática en respuesta a la derivación del jugo biliopancreático es menor en ratas vagotomizadas o tras la ablación de las fibras aferentes sensoriales del vago mediante la aplicación de capsaicina [Li, 1994].

Sobre la secreción estimulada, el tratamiento con indazol no mostró ningún efecto sobre la respuesta enzimática a dosis subóptimas y óptimas de ceruleína. Sin embargo, este inhibidor neural contrarrestó parcialmente la supresión de la secreción inducida por dosis supramáximas de ceruleína. Este mismo efecto contrarrestador se observó cuando L-NAME fue administrado 25 minutos antes que la ceruleína.

Aunque L-NAME inhibe las tres isoenzimas de la NOS, su efecto sobre la NOS neural se manifiesta más tardíamente que sobre la isoenzima endotelial. A los 2 o 3 minutos de la administración de L-NAME puede observarse un incremento de la presión arterial, relejo de su acción inhibidora sobre la NOS endotelial. Sin embargo, el efecto de L-NAME alcanza su expresión completa transcurridos 15 minutos desde su administración sistémica [Moore, 1991]. En nuestros experimentos, es a los 25 minutos desde la aplicación de L-NAME cuando la secreción pancreática inhibida por dosis supramáximas de ceruleína presenta una respuesta paradójica consistente en un aumento de la secreción.

El patrón de respuesta secretora conseguido con indazol fue reproducido con capsaicina. Es decir, redujo la secreción basal y contrarrestó parcialmente la inhibición del débito de amilasas tras la estimulación con dosis supramáximas de ceruleína. Tanto la capsaicina como la inhibición de la NOS neural producen un efecto anti-nocioceptivo e impiden la liberación de neuropéptidos [Bevan, 1990; Moore, 1991; Dray, 1992; Kajekar, 1995; Birder, 1997]. Ello sugiere que aquellas condiciones que empeoren la transmisión neural producen sobre la curva de

secreción obtenida en respuesta a la dosis crecientes de ceruleína un desplazamiento hacia la derecha. Esta variación en el patrón de secreción refleja una pérdida de sensibilidad a la acción de la colecistokinina: las ratas no responden al incremento de los niveles de colecistokinina originados por la derivación del jugo biliopancreático pero son capaces de presentar una respuesta secretora ante la estimulación supramáxima con ceruleína, que en condiciones normales suprimiría la secreción de amilasas.

Con la utilización de L-NAME pudimos observar un doble efecto sobre la secreción pancreática: inmediatamente después de su administración L-NAME causó una disminución de la secreción basal y estimulada por dosis supramáximas de ceruleína, de acuerdo con observaciones previas [Molero, 1995]. Contrariamente, cuando el páncreas es estimulado una vez transcurrido un período de tiempo desde la administración de L-NAME (25-35 minutos), el patrón de respuesta secretora es paralelo al observado tras el tratamiento con indazol o con capsaicina, dos tentativas farmacológicas independientes que resultan en un empeoramiento de la transmisión neural. Además, a los 25 minutos, L-NAME no produce más incremento en la tensión arterial (de hecho, se inicia un lento descenso de los valores de presión media arterial registrados) pero es en este momento cuando consigue una inhibición total y completa de la NOS neural [Moore, 1991]. Ello sugiere que la inhibición de la NOS neural puede suprimir o revertir totalmente el efecto producido por el bloqueo de la NOS endotelial sobre la secreción pancreática.

Con el fin de reforzar esta hipótesis diseñamos una serie de experimentos dirigidos a analizar de forma aislada el efecto de la inhibición de la NOS endotelial sobre la secreción pancreática. Como no disponíamos de un inhibidor selectivo de la isoenzima endotelial de la NOS utilizamos hemoglobina reducida, una molécula con gran avidez para captar e inactivar el NO libre que circula por el torrente sanguíneo [Feelish, 1987; Moncada, 1991]. Otra propiedad interesante de la hemoglobina es que no interfiere en las vías intracelulares del NO ni en la transmisión neural nitrérgica *in vivo* [Jenkinson, 1995]. Únicamente existe un estudio *in vitro* que atribuye una acción inhibidora de la hemoglobina sobre la neurotransmisión mediada por NO

[Rattan, 1995]. Sin embargo, nuestro conocimiento actual sobre las moléculas de hemoglobina nativa o modificadas artificialmente así como las características de su unión al NO hace cuestionables algunas conclusiones en torno a los efectos de la administración de hemoglobina sobre la neurotransmisión del NO *in vivo* [Murray, 1995]. Debido a su alta afinidad por el NO, la hemoglobina infundida por vía endovenosa rápidamente reacciona con el NO libre circulante (la reacción es instantánea) dando lugar a una molécula de nitrato (NO_3^-) y otra de methemoglobina. Esta reacción constituye la base de un reconocido método para medir NO [Hevel, 1994].

La sustracción del NO libre de la circulación sanguínea induce un aumento transitorio en la presión arterial media y un incremento en las resistencias vasculares periféricas [Hess, 1993; Jia, 1996]. Para captar el NO existente en un espacio sináptico, donde este radical es liberado por un terminal nerviosa, la hemoglobina debe abandonar el espacio intravascular y difundir hacia la sinapsis neuronal, todo ello sin perder su capacidad de captación del NO. Sin embargo, la hemoglobina que circula libremente por la sangre es rápidamente metabolizada a formas que carecen de esta afinidad por el NO. Incluso, existen derivados hemoglobínicos nitrosilados que poseen actividad vasodilatadora [Jia, 1996]. Por tanto, es posible que algunos de los efectos sobre la neurotransmisión *in vivo* atribuidos a la hemoglobina sean dependientes de los productos derivados de su metabolismo [Somers, 1997; Everse, 1997].

En condiciones fisiológicas, el NO circulante refleja mayormente la actividad de la NOS endotelial. El NO es el principal regulador del tono vascular. La liberación continuada de cantidades picomolares de NO por parte de las células endoteliales es el mecanismo responsable de controlar la tensión arterial en condiciones basales [Rees, 1989]. Las variaciones observadas en la presión arterial en respuesta a los diferentes inhibidores del NO es reflejo, principalmente, de los cambios en la concentración del NO circulante. La infusión de hemoglobina indujo un rápido y marcado incremento de la presión arterial y paralelamente una reducción en la producción de amilasas. En contraste, la administración de albúmina en una cantidad iso-oncótica a la de la hemoglobina utilizada causó un pequeño incremento

de la presión arterial y de la secreción de amilasas. Esta divergencia de efectos se explica posiblemente por las diferentes interacciones que establecen la hemoglobina y la albúmina con el NO libre. La hemoglobina capta e inactiva el NO [Feelish, 1987; Moncada 1991; Jia, 1996], en tanto que la albúmina actúa como transportador del NO puniéndolo a disposición de la microvasculatura, donde este vasodilatador ejercerá su efecto [Stamler, 1992b]. La reducción de la producción de amilasas obtenida tras la estimulación supramáxima con ceruleína fue potenciada con la administración de hemoglobina. Éste fue un efecto superponible al obtenido con L-NAME al ser co-administrado con la ceruleína, y opuesto al patrón de secreción inducido por capsaicina e indazol.

Otra observación interesante fue el efecto que la ceruleína produjo sobre la presión arterial. A dosis supramáximas, la ceruleína aumentó la presión arterial y potenció el incremento de la presión inducido por la hemoglobina. En contraste, dosis subóptimas de este secretagogo, que obtendrían un nivel en plasma equiparable a la concentración de colecistokinina postprandial, ocasionaron una transitoria, aunque evidente reducción de la presión media arterial.

Aunque los efectos de la ceruleína en la microvasculatura son conocidos desde hace años, los mecanismos subyacentes responsables de esta vasorreactividad son poco conocidos. En perros, la inyección endovenosa de ceruleína a dosis que consigan una estimulación óptima de la secreción pancreática ocasionan una reducción de la presión arterial [Erspamer, 1967]. Asimismo, el efecto opuesto que pudimos observar con 10 µg/kg de ceruleína es congruente con otras observaciones experimentales sobre el incremento de la presión arterial tras estas dosis de ceruleína [Bertolini, 1986].

Estudios previos ya habían demostrado que la inhibición de la NOS mediante L-NAME agrava la pancreatitis aguda inducida por ceruleína [Molero, 1995; Werner, 1997]. Basados en las observaciones relativas al efecto contrarrestador de indazol sobre la supresión de la secreción de amilasas inducida por dosis de ceruleína que generan pancreatitis aguda, planteamos investigar si el bloqueo de la NOS neural con indazol pudiera evitar o aminorar la lesión desarrollada en la pancreatitis

aguda.

El NO se ha implicado en la patogenia del desarrollo de edema en algunos modelos de inflamación neurogénica [Kajekar, 1995]. Si la acción neural del NO contribuye a la formación de edema en la pancreatitis aguda, sería esperable reducir la cantidad de líquido acumulado en el páncreas mediante tratamiento con indazol.

Cuando la pancreatitis aguda por ceruleína se indujo en ratas tratadas con indazol pudimos observar los siguientes hechos. La hiperamilasemia en plasma no aumentó respecto a las ratas no tratadas, lo cual contrasta con el efecto de L-NAME co-administrado con ceruleína en el mismo modelo de pancreatitis aguda [Molero, 1995]. Por otra parte, y en contra de nuestra hipótesis inicial, indazol no disminuyó la cantidad de líquido acumulado en páncreas, lo cual sugiere que la transmisión neural no se halla implicada de forma importante en la formación de edema presente en este modelo de inflamación. Por último, indazol ocasionó una reducción de la actividad MPO, hecho también contrario a lo sucedido con L-NAME, ya que este inhibidor universal de NOS se había asociado anteriormente a un aumento de la actividad MPO en la pancreatitis aguda por ceruleína [Molero, 1995]. Ello sugiere que la NOS neural podría ejercer un papel permisivo sobre la infiltración leucocitaria, aunque ello no revierta en un beneficio sobre la lesión pancreática.

La NOS es un enzima que se halla ampliamente distribuido en el organismo y está presente en diferentes tipos celulares de un mismo órgano, como ocurre en el páncreas (endotelio, neuronas, Islotes de Langerhans). El bloqueo general de la actividad NOS mediante un inhibidor universal como es L-NAME puede ocasionar efectos opuestos en la función de un órgano, dependiendo de cual sea la vía celular principalmente afectada o de la activación alternativa de mecanismos compensadores. Ello explicaría la dualidad de los efectos obtenidos tanto sobre la secreción pancreática como sobre la pancreatitis aguda según la utilización de indazol o de L-NAME.

IV. CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS

CONCLUSIONES DERIVADAS DE LOS ESTUDIOS DE SECRECIÓN

Los estudios farmacológicos aquí presentados sugieren que la supresión de la actividad enzimática endotelial conlleva una reducción de la secreción pancreática exocrina basal y estimulada. Esta inhibición de la eNOS potencia la supresión de la secreción observada con dosis supramáximas de ceruleína.

La actividad de la NOS neural es también importante en el control de la secreción pancreática. En general, su inhibición resulta en efectos contrarios a la inhibición de la NOS endotelial, posiblemente al alterar los mecanismos de control neural. Su inhibición desvela la implicación de la transmisión nitrérgica en los mecanismos relacionados con la pancreatitis aguda por ceruleína. La inhibición de la nNOS contrarresta los efectos inhibidores de dosis farmacológicas de ceruleína que inducen pancreatitis aguda y al tiempo mejora los parámetros de gravedad de este tipo de pancreatitis.

CONCLUSIONES DERIVADAS DE LOS ESTUDIOS DE PANCREATITIS AGUDA

En la pancreatitis aguda, tanto en la forma edematosa como en la necrohemorrágica, se produce una activación de la iNOS, como así lo demuestran los estudios inmunohistoquímicos y los elevados niveles de nitritos y nitratos en plasma. Sin embargo, solo en la forma necrohemorrágica se observa lesión asociada a la formación de peroxinitritos.

La inhibición de la actividad iNOS en la pancreatitis aguda edematosa y necrohemorrágica resulta en un empeoramiento del daño pancreático. La deficiente infiltración leucocitaria en el tejido agredido cuando se inhibe la formación del NO de origen inducible podría jugar un papel crítico en el empeoramiento de la lesión.

SECRECION PANCREATICA DE AMILASAS *IN VIVO* EN RESPUESTA A DOSIS CRECIENTES DE CERULEINA

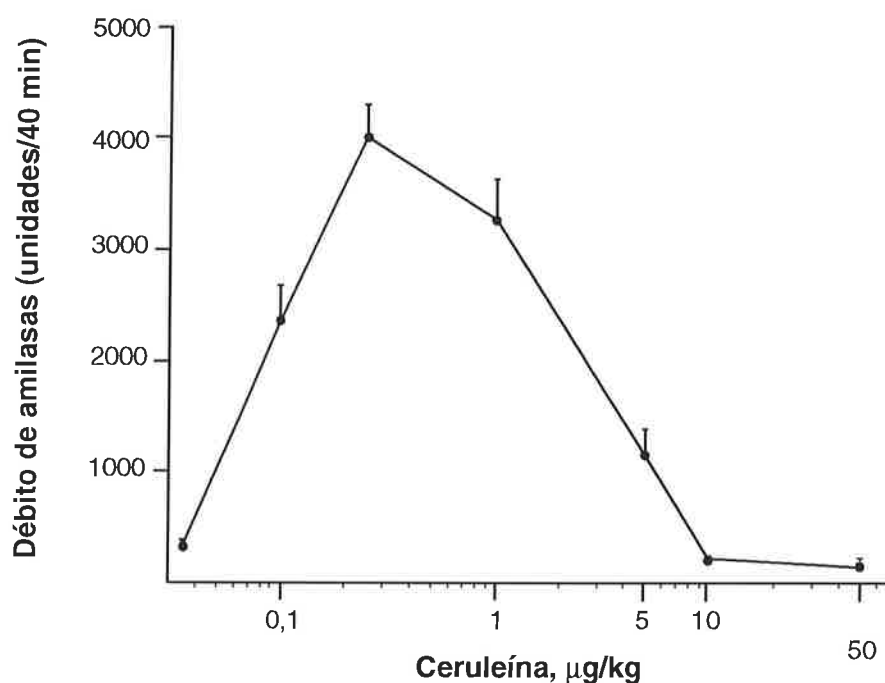


Figura 1. Tras la estimulación pancreática con dosis crecientes de ceruleína, la secreción de amilasas en el jugo biliopancreático sigue una curva dosis-respuesta con un patrón bifásico característico. A medida que se incrementa la concentración de ceruleína el débito de amilasas aumenta. Al llegar a dosis óptimas de ceruleína ($0.25 \mu\text{g/kg}$) la secreción obtenida es máxima y con dosis superiores a $0.25 \mu\text{g/kg}$ la secreción enzimática es decreciente.

Cada punto representa la media $\pm$ EE ($n = 6-8$) del débito de amilasas obtenido durante los 40 minutos posteriores a la inyección i.v. de ceruleína. Las dosis de ceruleína utilizadas se representan en escala semilogarítmica.

PRESION MEDIA ARTERIAL TRAS DIFERENTES CONDICIONES DE MANIPULACION DEL OXIDO NITRICO

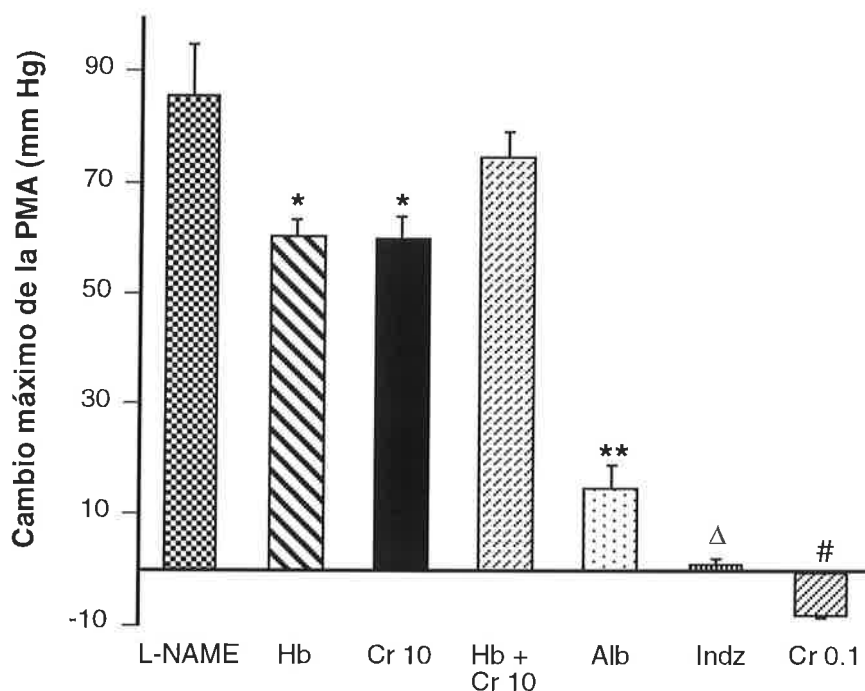


Figura 2. La administración de L-NAME (30 mg/kg, e.v.) o hemoglobina (1 g/kg, e.v.) ocasionó un importante aumento de la PMA, que fue de mayor intensidad en el grupo de L-NAME. Este hecho refleja el efecto inhibitorio de estos fármacos sobre la acción endotelial del óxido nítrico. La administración conjunta de hemoglobina y dosis suprmáximas de ceruleína (10 μ /kg) potenció el aumento de la PMA generado por ambos fármacos. La albúmina utilizada en una cantidad isooncótica a la de la hemoglobina (970 mg/kg, e.v) originó un pequeño aunque significativo aumento de la PMA, posiblemente resultado de la capacidad de transporte del óxido nítrico y del efecto osmótico de esta molécula. La inhibición selectiva de la NOS neural con indazol (100 mg/kg, i.p.) no modificó la PMA. Dosis subótimas de ceruleína se ocasionaron un pequeño descenso de la PMA.

Los diagramas de barras representan la media $\pm$ EE (n = 6-8) del incremento máximo de la presión media arterial (PMA) respecto al propio valor basal en respuesta a diferentes fármacos. * $p < 0.05$ respecto al grupo de L-NAME. **, Δ, # $p < 0.05$ respecto a los demás grupos. Comparación entre grupos realizada mediante análisis de la varianza (ANOVA).

SECRECION PANCREATICA DE AMILASAS NO ESTIMULADA TRAS LA ADMINISTRACION DE DIFERENTES FARMACOS

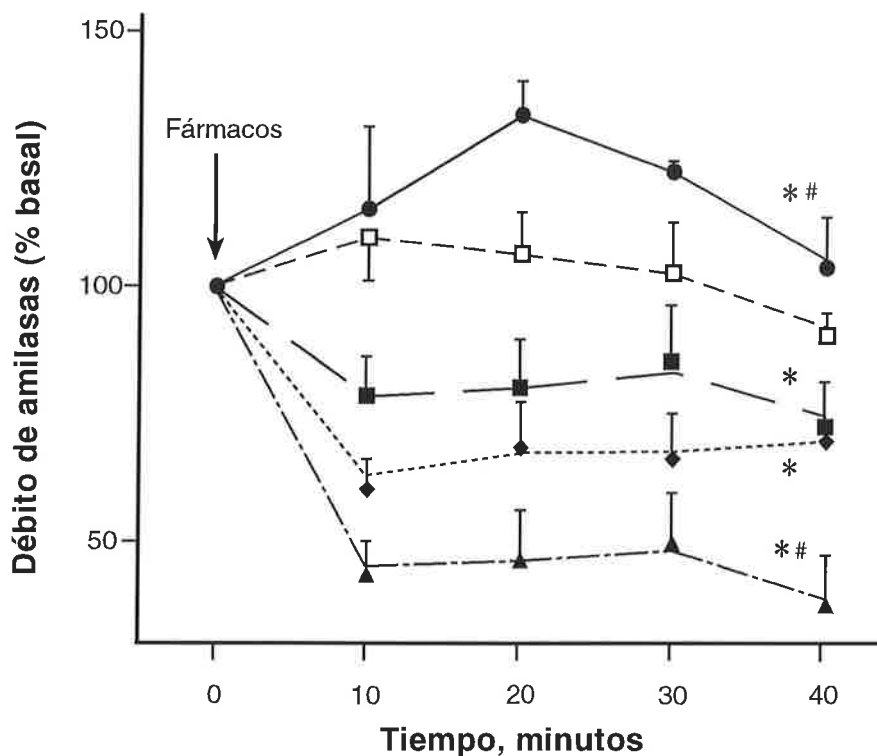


Figura 3. Estas curvas expresan la secreción de amilasa en el jugo biliopancreático tras la administración en el tiempo 0 de albúmina (●), suero fisiológico (□), hemoglobina (■), L-NAME (◆) o indazol (▲). El débito basal se considera el 100% para cada rata. Cada uno de los puntos representa la media $\pm$ EE (n = 6-8) del débito de amilasas en 10 minutos expresado como porcentaje de variación respecto al valor basal.

La administración de hemoglobina o L-NAME redujeron significativamente la secreción no estimulada de amilasas. Esta disminución fue aún mayor en las ratas tratadas con indazol. en contraraste con la hemoglobina, la albúmina aumentó la secreción de amilasas tras su infusión.

* $p < 0.05$ respecto al grupo control (suero fisiológico), # $p < 0.05$ respecto a los demás grupos. Comparaciones realizadas mediante análisis de la varianza (ANOVA) para mediciones repetidas en cada uno de los puntos.

EFFECTO DEL INDAZOL SOBRE LA SECRECION PANCREATICA ESTIMULADA POR CERULEINA

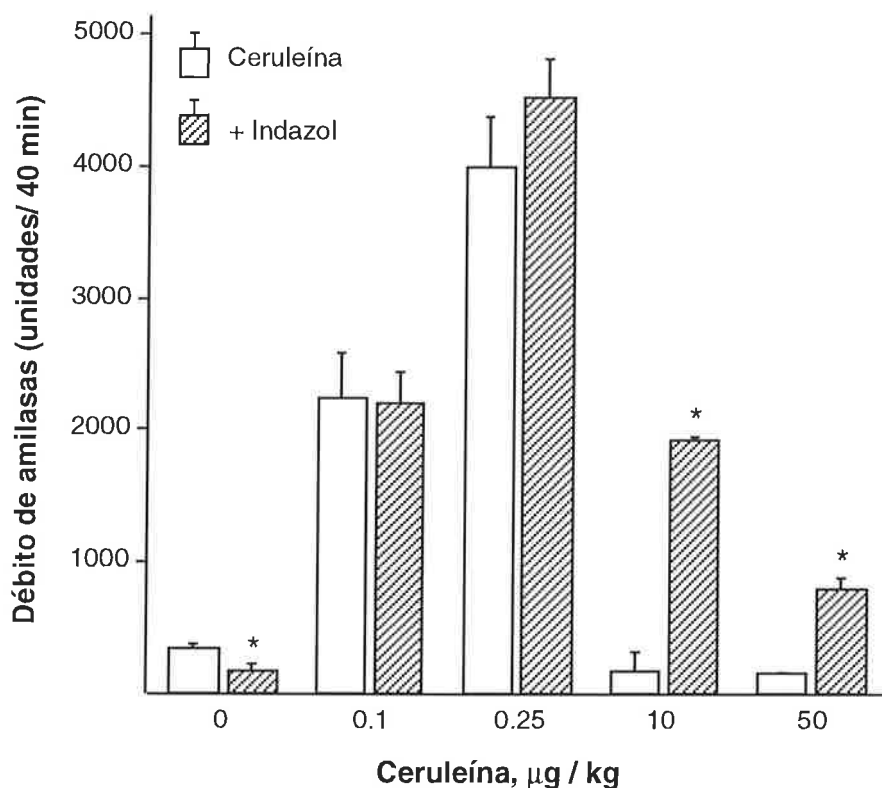


Figura 4. El diagrama de barras expresa la media $\pm$ EE (n = 6-8) de la secreción de amilasas en jugo biliopancreático recogido durante los 40 minutos posteriores a la administración de dosis crecientes de ceruleína en ratas prtratadas o no con indazol.

Sobre la secreción no estimulada el indazol ejerció un efecto inhibitorio. A dosis subóptimas (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y óptimas (0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de ceruleína el indazol no modificó la secreción enzimática. Sin embargo, la inhibición de la secreción producida por dosis suprmáximas de ceruleína fue contrarrestada, en parte, en las ratas tratadas con indazol.

* p < 0.05 respecto al grupo de ceruleína sola. Comparaciones entre grupos con igual dosis de ceruleína realizadas mediante t de Student.

EFFECTOS DE LA INHIBICION DEL NO SOBRE LA SECRECION DE AMILASAS ESTIMULADA POR DOSIS SUPRAMAXIMAS DE CERULEINA

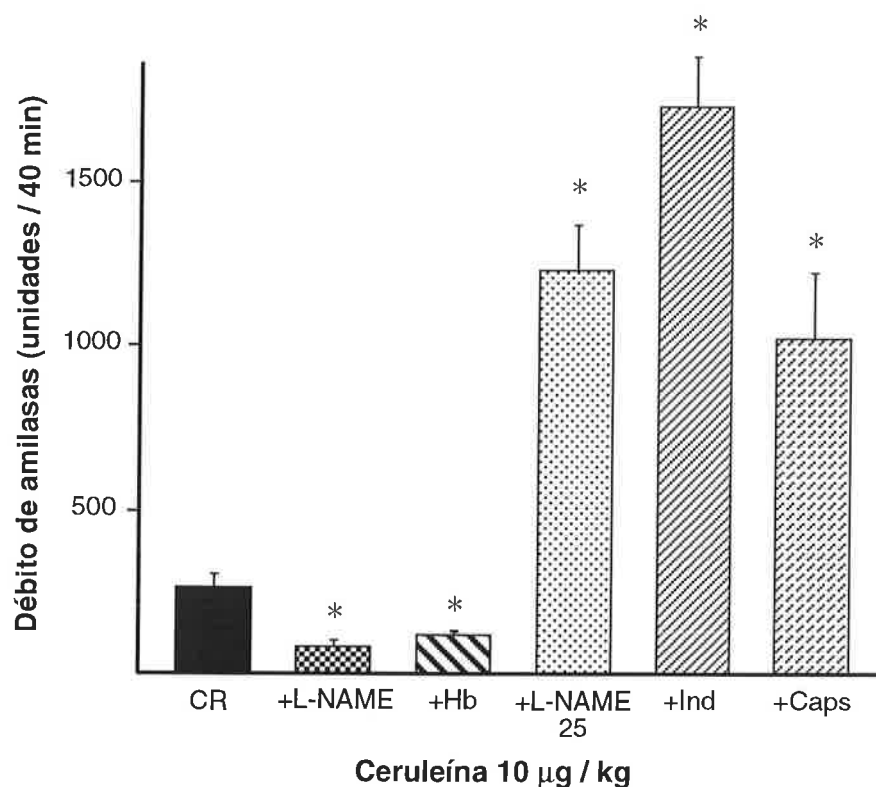


Figura 5. La ceruleína (10 μ g/kg) fue perfundida en bolus e.v. de forma aislada o tras la administración de L-NAME (30 mg/kg), hemoglobina (1 g/kg), indazol (100 mg/kg) o capsaicina. Los fármacos fueron administrados 2 minutos antes de la ceruleína salvo L-NAME 25 (25 minutos antes) y capsaicina (5 días antes del experimento).

Dosis supramáximas de ceruleína generaron una pobre respuesta secretora. Este efecto fue potenciado por la coadministración de L-NAME o de hemoglobina. El bloqueo de la actividad de la NOS neural (L-NAME previo o indazol) contrarrestó el efecto inhibitor ocasionado por la ceruleína. Este efecto fue reproducido mediante la inactivación de las fibras sensoriales aferentes con capsaicina.

Los diagramas de barras representan la media $\pm$ EE (n = 8) del débito de amilasas recogido en jugo biliopancreático durante los 40 minutos posteriores a la administración de fármacos. * p < 0.05 respecto al grupo tratado con ceruleína sola.

EFFECTO DE L-NAME ADMINISTRADO A DIFERENTES TIEMPOS SOBRE SECRECIÓN DE AMILASAS

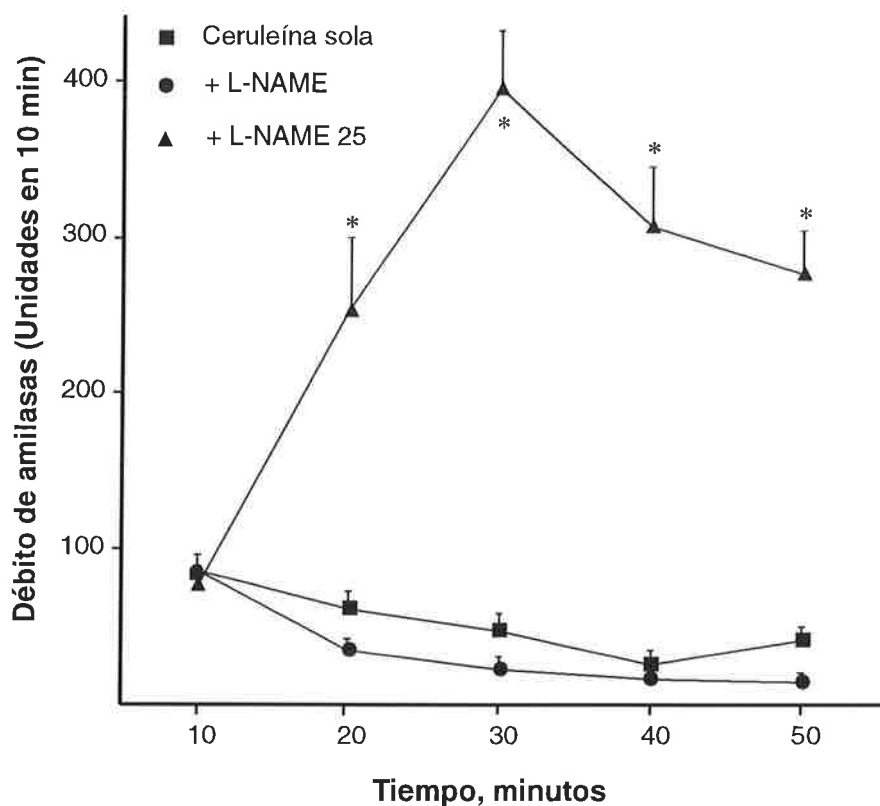


Figura 6. Una dosis de 10 $\mu\text{g/kg}$ de ceruleína produce una inhibición de la secreción pancreática *in vivo*. La administración conjunta de L-NAME potencia esta inhibición. Sin embargo, el pretratamiento con L-NAME 25 minutos antes induce una respuesta paradójica, potenciando la secreción pancreática.

Cada punto representa la media $\pm$ EE ($n = 6-8$) del débito de amilasas obtenido en fracciones de 10 minutos tras la estimulación con ceruleína 2 o 25 minutos después de la administración de L-NAME. * $p < 0.05$ respecto al ceruleína sola o ceruleína + L-NAME

ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA EN LA PANCREATITIS AGUDA

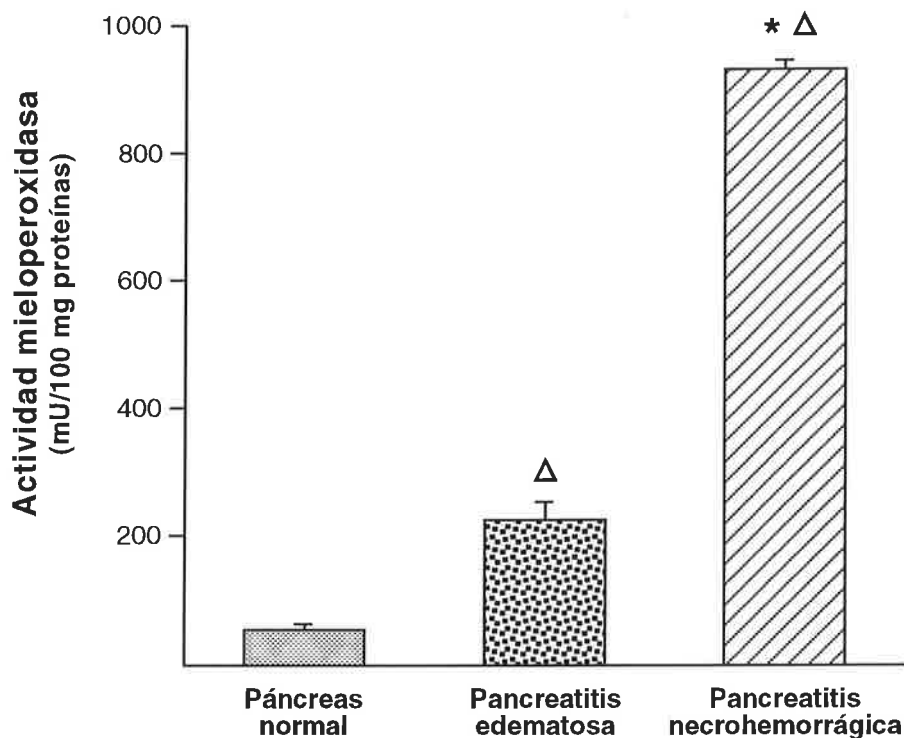


Figura 7. La mieloperoxidasa, índice de infiltración leucocitaria, mostró un considerable aumento de su actividad enzimática en los páncreas sometidos a pancreatitis aguda respecto a los páncreas normales. Este incremento fue mucho mayor en la pancreatitis necrohemorrágica que en la edematosa. Dichos resultados reflejan el grado de infiltración leucocitaria tisular en la pancreatitis aguda, que es superior en la forma necrohemorrágica.

Cada columna representa la media $\pm$ EE ($n = 8$) de la actividad mieloperoxidasa en páncreas. * $p < 0.001$ respecto al grupo de pancreatitis edematosa. Δ $p < 0.001$ respecto al grupo de páncreas normal. Comparaciones múltiples realizadas mediante test de análisis de la varianza (ANOVA).

PEPTIDOS DE ACTIVACION DEL TRIPSINOGENO EN LA PANCREATITIS AGUDA

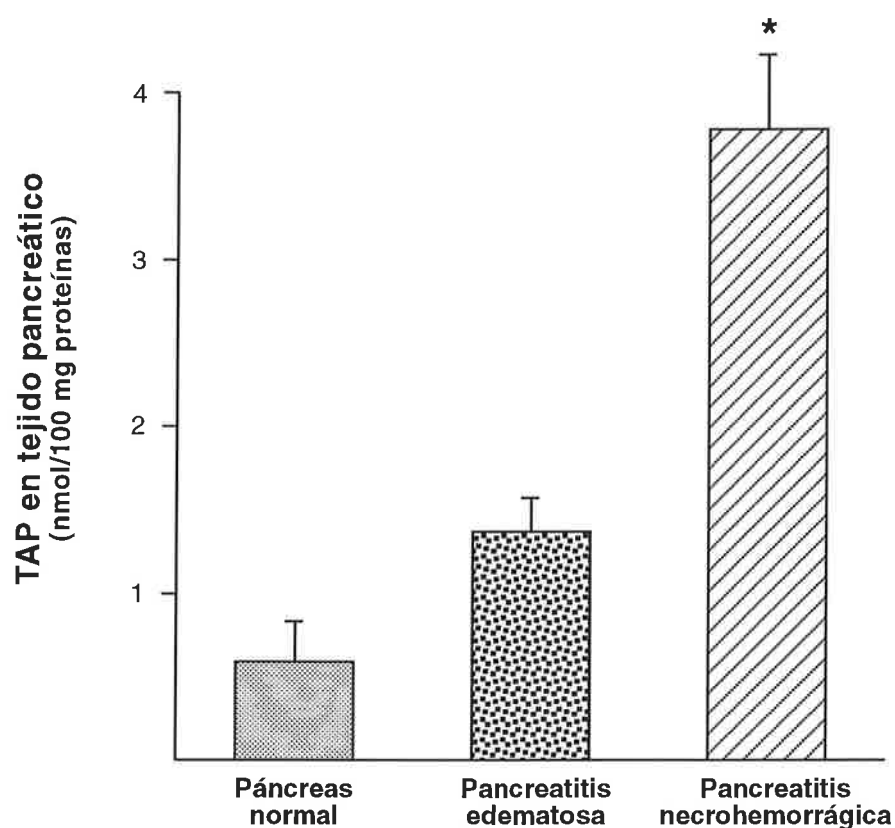


Figura 8. En la pancreatitis edematosa la concentración pancreática de péptidos de activación del tripsinógeno (TAP) aumentó de forma no significativa respecto al grupo de páncreas normal. En contraste, la forma necrohemorrágica mostró una gran cantidad pancreática de TAP. Estos hallazgos se asocian a la severidad de la lesión pancreática (necrosis tisular), que es menor en la pancreatitis edematosa y severa en la necrohemorrágica.

Cada columna representa la media $\pm$ EE ($n = 6-8$) de la concentración de TAP en tejido pancreático. * $p < 0.05$ respecto al correspondiente grupo de páncreas normal. Comparaciones múltiples realizadas mediante test de análisis de la varianza (ANOVA).

CONCENTRACION PLASMATICA DE NITRITOS/NITRATOS EN LA PANCREATITIS AGUDA

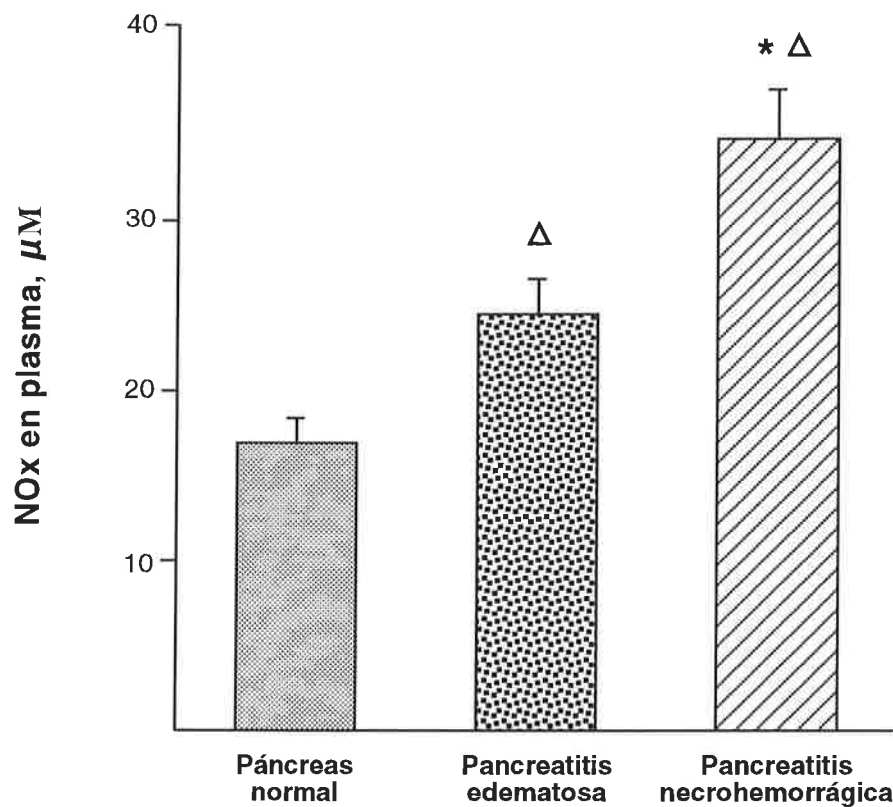


Figura 9. La pancreatitis aguda se asoció a una mayor concentración de nitritos/nitratos en plasma en comparación con el grupo de páncreas normal. Este aumento fue mayor en la forma necrohemorrágica que en la edematosa. Esta observación sugiere la activación enzimática de la NOS en el proceso inflamatorio desarrollado en la pancreatitis aguda. Dicha actividad es superior en la pancreatitis de mayor gravedad.

Cada columna representa la media $\pm$ EE ($n = 8$) de la concentración plasmática de NOx. * $p < 0.05$ respecto al grupo de pancreatitis edematosa. Δ $p < 0.05$ respecto al grupo de páncreas normal. Comparaciones múltiples realizadas mediante test de análisis de la varianza (ANOVA).

CORRELACION ENTRE ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA EN PANCREAS Y CONCENTRACION PANCREATICA DE TAP O NIVELES PLASMATICOS DE NOx EN LA PANCREATITIS AGUDA

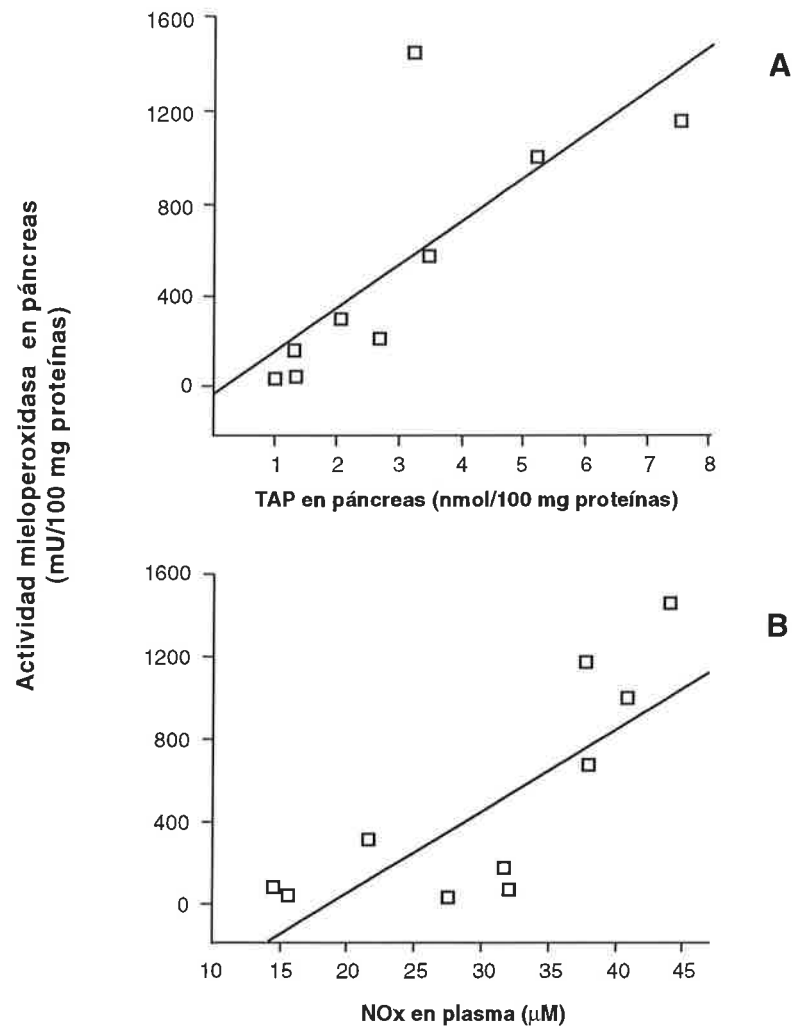


Figura 10. (A) En la pancreatitis aguda el incremento de actividad pancreática de MPO mostró una buena correlación con el aumento en la concentración tisular de TAP ($r=0,76$; $p=0,02$) y **(B)** con la elevación plasmática de NOx ($r=0.76$; $p=0.006$).

Correlaciones entre parámetros analizadas mediante regresión lineal.

EFFECTO DE LA AMINO GUANIDINA SOBRE LA ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE AMILASAS EN LA PANCREATITIS AGUDA

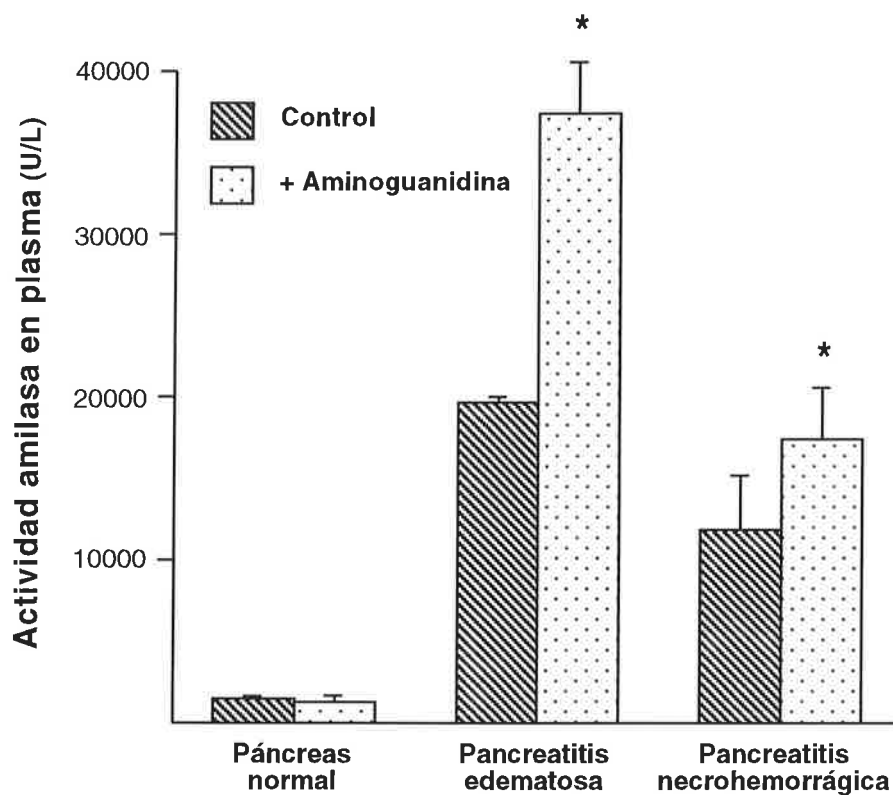


Figura 11. El aumento de la actividad amilasa en plasma observado a las 6 horas de evolución de la pancreatitis fue significativamente superior en las ratas que recibieron aminoguanidina respecto a su correspondiente grupo control. Este hecho traduce una mayor severidad de la pancreatitis aguda cuando la NOS inducible se mantiene inhibida. La aminoguanidina sola no modificó el nivel plasmático de actividad amilasa

Cada columna representa la media $\pm$ EE ($n = 8$) de la actividad plasmática de amilasa. * $p < 0.05$ respecto al correspondiente grupo control. Comparaciones realizadas entre grupos con igual tipo de pancreatitis mediante t de Student.

EFFECTO DE LA AMINOGUANIDINA SOBRE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA EN TEJIDO PANCREATICO

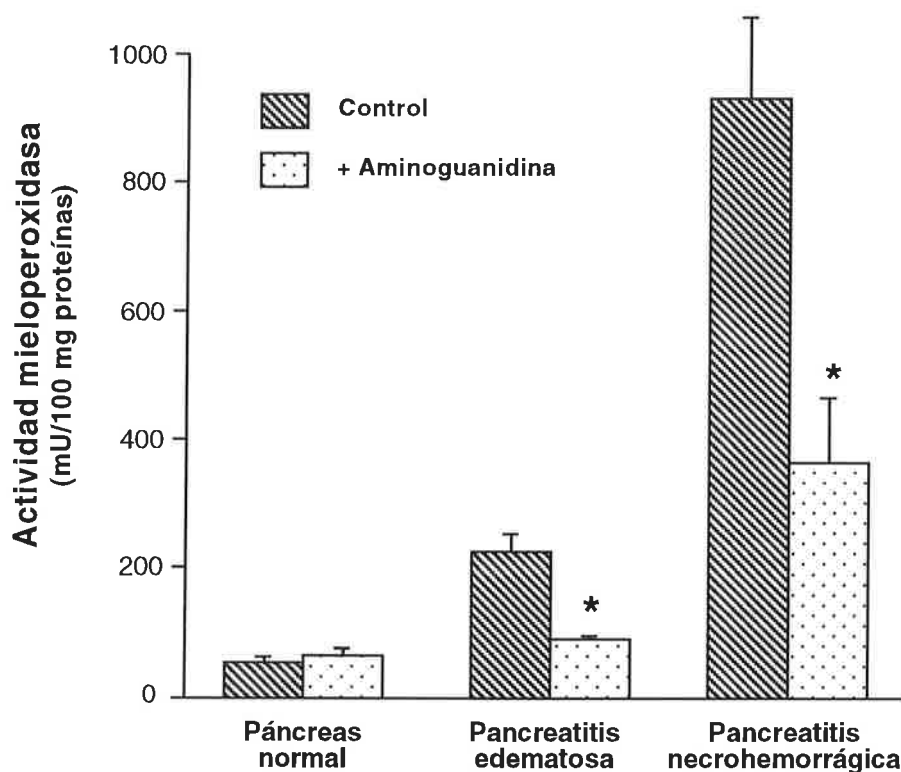


Figura 12. A las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda, las ratas pretratadas con aminoguanidina mostraron una menor actividad mieloperoxidasa en páncreas respecto al correspondiente grupo de pancreatitis. Ello traduce la existencia de una menor infiltración leucocitaria en el tejido pancreático lesionado cuando los animales carecen de actividad inducible de la NOS.

Cada columna representa la media $\pm$ EE (n = 8) de la actividad plasmática de amilasa. * $p < 0.05$ respecto al correspondiente grupo de pancreatitis aguda. Comparaciones realizadas entre grupos con igual tipo de pancreatitis mediante t de Student.

EFFECTO DE LA AMINOGUANIDINA SOBRE LOS PEPTIDOS DE ACTIVACION DEL TRIPSINOGENO EN LA PANCREATITIS AGUDA

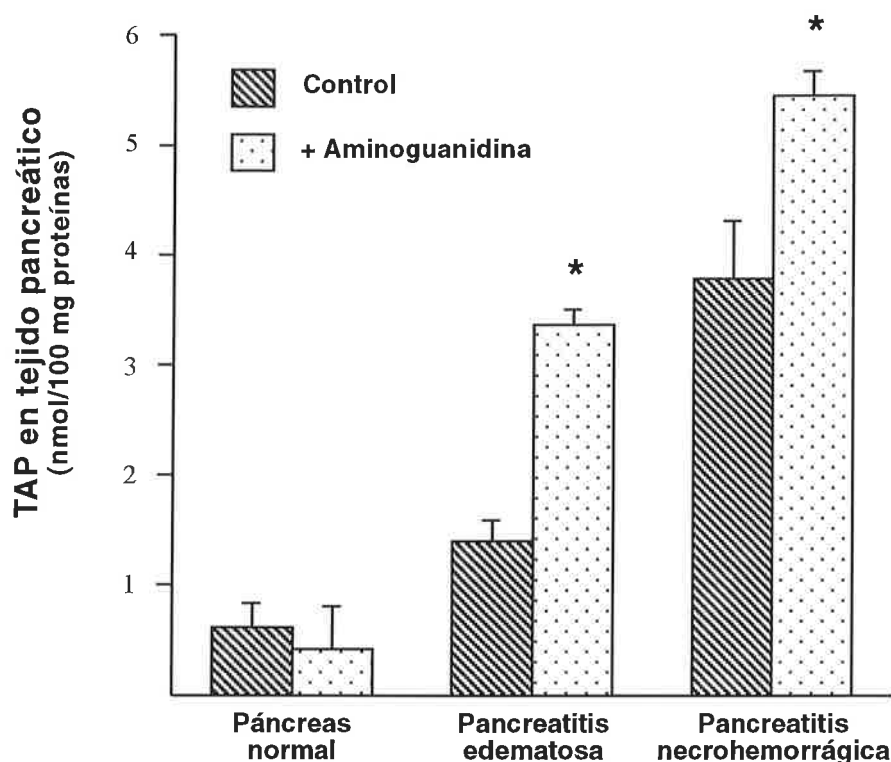


Figura 13. El pretratamiento con aminoguanidina causó un aumento significativo del contenido pancreático de TAP (marcador relacionado con necrosis pancreática y mortalidad en la pancreatitis aguda) en comparación con el respectivo grupo de pancreatitis no pretratado. Estos resultados sugieren que la lesión pancreática desarrollada en la pancreatitis aguda es mayor cuando la NOS inducible se halla inhibida. En el grupo de páncreas normal la aminoguanidina no modificó la concentración de TAP.

Cada columna representa la media $\pm$ EE ($n = 6-8$) de la concentración de TAP en tejido pancreático. * $p < 0.05$ respecto al correspondiente grupo de pancreatitis aguda. Comparaciones realizadas entre dos grupos con igual tipo de pancreatitis mediante t de Student.

EFFECTO DE LA AMINO GUANIDINA SOBRE LA CONCENTRACION PLASMATICA DE NITRITOS/NITRATOS EN LA PANCREATITIS AGUDA

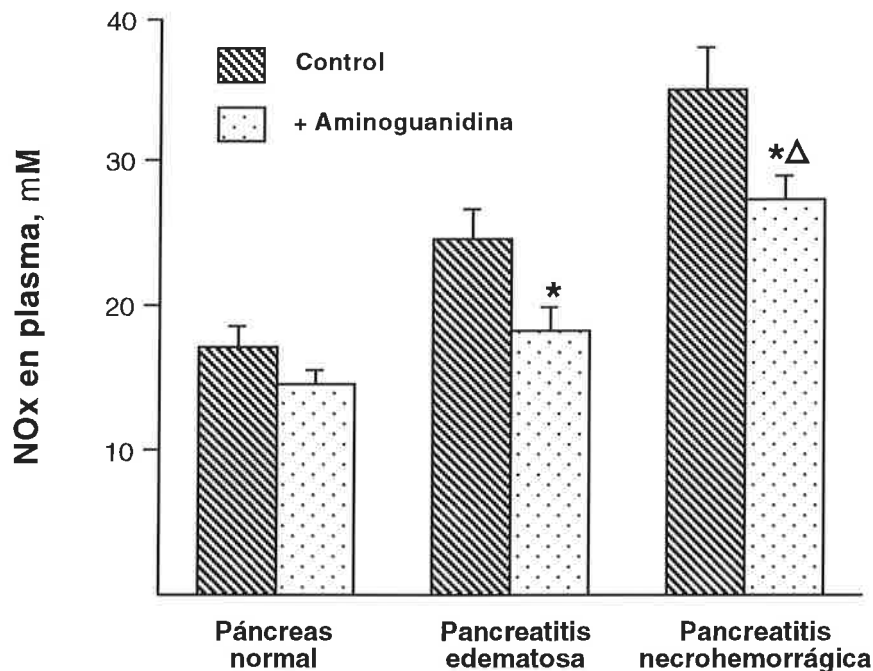


Figura 14 . El aumento de los niveles plasmáticos de nitritos/nitratos (NOx) observado en la pancreatitis aguda se redujo significativamente en las ratas tratadas con aminoguanidina. Ello refleja la existencia de actividad inducible de la NOS en la pancreatitis aguda, inhibible con aminoguanidina (inhibidor selectivo de la iNOS). Esta actividad enzimática representa la principal fuente de producción de NO en la pancreatitis aguda edematosa. En la forma necrohemorrágica la aminoguanidina redujo el incremento de NOx en casi un 50%, no consiguiendo disminuir la concentración hasta el nivel basal. En las ratas normales la aminoguanidina no modificó la concentración de NOx.

Cada columna representa la media $\pm$ EE (n = 8) de la actividad plasmática de amilasa. * $p < 0.05$ respecto al correspondiente grupo de pancreatitis aguda. Δ $p < 0.05$ respecto al control del grupo de páncreas normal. Comparaciones entre dos grupos con igual tipo de pancreatitis realizadas mediante t de Student. Comparaciones múltiples entre grupo de páncreas normal y los dos grupos de pancreatitis realizadas mediante análisis de la varianza (ANOVA).

EFFECTO DE LA AMINOGUANIDINA SOBRE EL GRADO DE CORRELACION ENTRE ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA EN PANCREAS Y CONCENTRACION PANCREATICA DE TAP O NIVELES PLASMATICOS DE NOx EN LA PANCREATITIS AGUDA

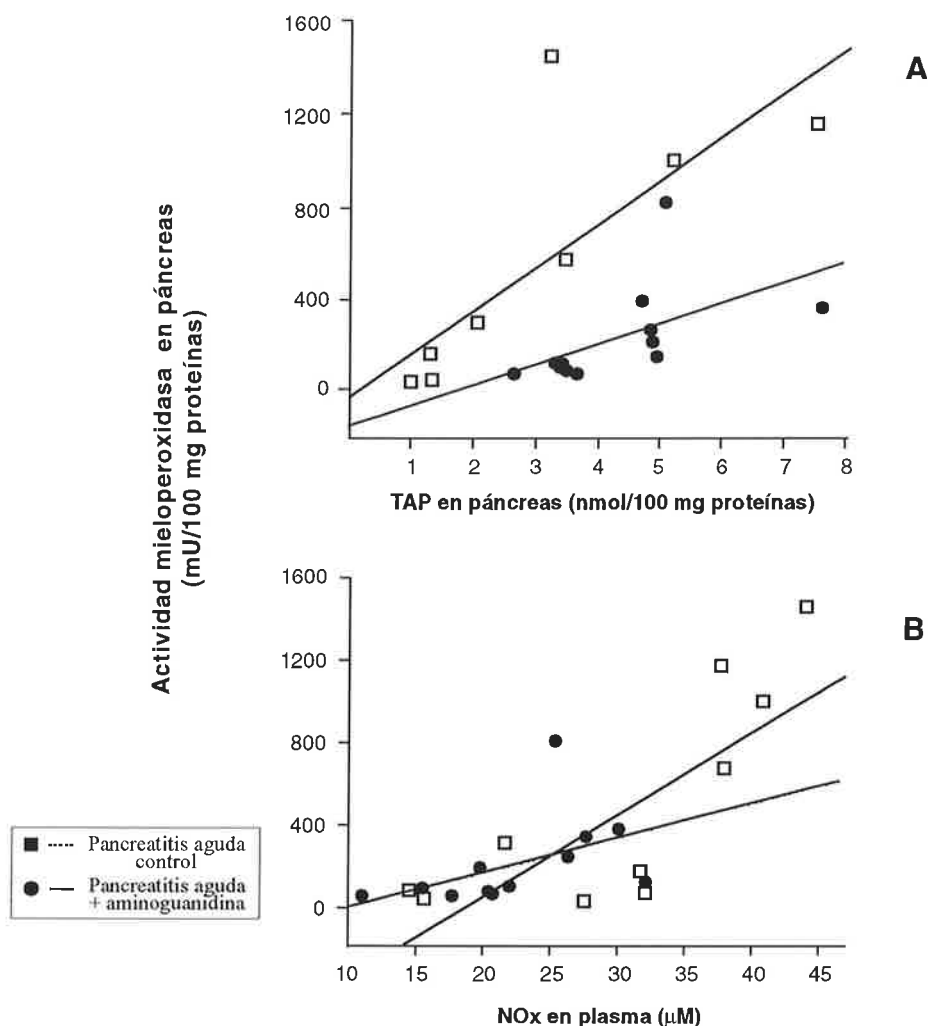


Figura 15. (A) En la pancreatitis aguda se observó una buena correlación entre el incremento de actividad MPO y el aumento en la concentración tisular de TAP ($r=0,76$; $p=0,02$). La aminoguanidina disminuyó considerablemente el grado de correlación entre ambos parámetros ($r=0.52$; $p=0.072$). **(B)** Asimismo, el grado de correlación existente entre MPO y NOx ($r=0.76$; $p=0.006$) fue menor en el grupo pretratado con aminoguanidina ($r=0.59$; $p=0.04$). Correlaciones entre parámetros analizadas mediante regresión lineal.

V. BIBLIOGRAFIA

A

Adler G, Beglinger C, Braun U, Reinshagen M, Arnold R. Interaction of the cholinergic system and cholecystokinin in the regulation of endogenous and exogenous stimulation of pancreatic secretion in humans. *Gastroenterology* 1991; 100: 537-543.

Anglade P, Michel C, Roze c. Intrinsic nerves of the pancreas after celiac and superior mesenteric ganglionectomy in rats: A morphologic study of acetylcholinesterase activity and catecholamine histofluorescence. *Pancreas* 1987; 2: 568-577.

Aho HJ, Koskensalo SML, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416.

B

Babbedge RC, Bland-War PA, Moore PK. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 225-228.

Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW, Michel T. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 14582-14586.

Bevan S, Szolcsnyi J. sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanism and applications. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 330-333.

Beglinger C, Fried M, Whitehouse I, Jansen JB, Lamers CB, Gyr K. Pancreatic enzyme responses to a liquid meal and to hormonal stimulation. Correlation with plasma secretin and cholecystokinin levels. *J Clin Invest* 1985; 75: 1171-1176.

Beierwaltes WH. Selective neuronal nitric oxide synthase inhibition blocks furosemide-stimulated renin secretion in vivo. *Am J Physiol* 1995; 269: F134-F139 .

Bertolini A, Guarini S, Ferrari W, Rompianesi E. Caerulein and cholecystokinin reverse experimental hemorrhagic shock. *Neuropeptides* 1986; 8: 25-31.

Birder LA, Kanai AJ, Groat WC. DMSO: effect on bladder afferent neurons and nitric oxide release. *J Urol* 1997; 158: 1989-1995.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 9030-9033.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347: 768-770 .

D

Dale WE, Turkelson CM, Solomon TE. Role of cholecystokinin in intestinal phase of meal-induced pancreatic secretion. *Am J Physiol* 1989; 257: G782-G790.

Dray A. Mechanism of action of capsaicin-like molecules on sensory neurons. *Life Sci* 1992; 51: 1759-1765.

E

Eastmond NC, Banks EM, Coleman JW. Nitric oxide inhibits IgE-mediated degranulation of mast cells and is the principal intermediate in IFN-gamma-induced suppression of exocytosis. *J Immunol* 1997; 159: 1444-1450.

C

Chey WY. Hormonal control of pancreatic exocrine secretion. En: Go VLW (ed.). *The pancreas. Biology, pathobiology, and disease*. Segunda edición. New York, Raven Press, 1993: 403-424.

Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C. Calmodulin as tightly bound subunit of calcium-, calmodulin-independent nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1992; 176: 599-604.

Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1992; 90: 1116-1121.

E

Ekblad E, Alm P, Sundler F. Distribution, origin and projections of nitric oxide synthase-containing neurons in gut and pancreas. *Neuroscience* 1994; 63: 233-248.

Erspamer V, Bertaccini G, De Caro G, Endean R, Impicciatore M. Pharmacological actions of caerulein. *Experientia* 1967; 23: 702-703.

Everse J, Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 1075-1099.

F

Fushiki T, Iwai K. Two hypothesis on the feedback regulation of pancreatic enzyme secretion. *Faseb J* 1989; 3: 121-126. Foitzik T, Hotz HG, Schmidt J, Klar E, Warshaw AL, Buhr HJ. Effect of microcirculatory perfusion on distribution of trypsinogen activation peptides in acute experimental pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2184-2188.

F

Fitzgerald M. Capsaicin and sensory neurones-a review. *Pain* 1983; 15: 109-130.

Feelish M, Noack EA. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J*

Pharmacol 1987; 139: 19-30.

Fushiki T, Fukuoka SI, Kajiura H, Imai K. Atropine-nonsensitive feedback mechanism of rat pancreatic enzyme secretion in response to food protein intake. J Nutr 1987; 117: 948-954.

Fushiki T, Iwai K. Two hypothesis on the feedback regulation of pancreatic enzyme secretion. FASEB J 1989; 3: 121-126.

G

Garbers DL. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. Cell 1992; 74: 1-4.

Gardner JD, Rottman AJ. Evidence against cyclic GMP as a mediator of the actions of secretagogues on amylase secretion from guinea-pig pancreas. Biochim Biophys Acta 1980; 627: 230-243.

Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. TINS 1991; 14: 60-67.

Green G, Lyman RL. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. Proc Soc Exp Biol Med 1972; 140: 6-12.

Griffiths OW, Kilbourn RG. Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. Methods Enzymol 1996; 268: 375-392.

Griffiths OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. Annu Rev Physiol 1995; 57: 707-736.

Grisham MB, Benoit JN, Granger DN. Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion in intestine. Meth Enzymol 1990; 186: 729-741.

Gukovskaya A, Pandol SJ. Nitric oxide production regulates cGMP formation and calcium influx in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* 1994; 266: G350-G356.

Gunther GR, Jamieson JD. Increased intracellular cGMP does not correlate with protein discharge from pancreatic acinar cells. *Nature* 1979; 280: 318-320.

Girolomoni G, Tigelaar RE. Capsaicin-sensitive primary sensory neurons are potent modulators of murine delayed-type hypersensitive reactions. *J Immunol* 1990; 145: 1105-1112.

H

Haimovits A, Scheele GA. Cellular cyclic nucleotides and enzyme secretion in the pancreatic acinar cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 156-160.

Hevel JM, Marletta MA. Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol* 1994; 233: 250-258.

Heisler s, Lambert M. Dissociation of cyclic GMP synthesis from cholinergic-stimulated secretion of protein from rat exocrine pancreas. *Can J Physiol Pharmacol* 1978; 56: 395-399.

Hess JR, MacDonald VW, Brinkley WW. Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J Appl Physiol* 1993; 74: 1769-1778.

Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18: 484-491.

Hosotani R, Chowdhury P, Rayford PL. L-364,718, a new CCK-antagonist inhibits postprandial pancreatic secretion and PP release in dogs: *Dig Dis Sci* 1989; 34: 462-467.

I

Ignarro LJ. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol* 1990 Jul; 67: 1-7

Iwatsuki K, Iijima F, Yamagishi F, Chiba S. Effects of nitroprusside on pancreatic exocrine secretion and cyclic nucleotide concentration in the dog pancreas. *Eur J Pharmacol* 1986; 123: 307-309.

J

Jenkinson KM, Reid JJ, Rand MJ. Hydroxocobalamin and haemoglobin differentiate between exogenous and neuronal nitric oxide in the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 1995; 275: 145-152.

Jensen RT. Receptors on pancreatic acinar cells. En: Johnson LR (ed.). *Physiology of the gastrointestinal tract*. Tercera edición. New York, Raven Press, 1994 (2):1377-1446.

Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *nature* 1996; 380: 221-226.

K

Kajekar R, Moore PK, Brain SD. Essential role for nitric oxide in neurogenic inflammation in rat cutaneous microcirculation. *Circ Res* 1995; 76: 441-447.

Keaney JF, Simon DI, Stamler JS, Jaraki O, Scharfstein J, Vita JA, Loscalzo J. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties. *J Clin Invest* 1993; 91: 1582-1589.

Kirchgessner AL, Gershon MD. Innervation of the pancreas by neuron in the gut. *J Neurosci* 1990; 10: 1626-1642.

Kirchgessner AL, Liu MT, Gershon MD. NADPH diaphorase (nitric oxide synthase)-containing nerves in the enteropancreatic innervation: sources, co-stored neuropeptides, and pancreatic function. *J Comp Neurol* 1994; 342: 115-130.

Kirchgessner AL, Liu MT. Presynaptic inhibition by serotonin of nerve-mediated secretion of pancreatic amylase. *Am J Physiol* 1995; 268: G339-G345.

Knoles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl acad Sci USA* 1991; 88: 4651-4655.

L

Lampel M, Kern H. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Hystopathol* 1977; 373: 97-117.

Larose L, Dumont Y, Asselin J, Morisset J, Poirer GG. Muscarinic receptor of rat pancreatic acini: (3H)QNB binding and amylase secretion. *Eur J pharmacol* 1981; 76: 247-254.

Layer PH, Chan ATH, Go VL, Zinsmeister AR, DiMagno EP. Adrenergic modulation of interdigestive pancreatic secretion in humans. *Gastroenterology* 1992; 103: 990-993.

Li Y, Owyang C. Vagal afferent pathway mediates physiological action of cholecystokinin on pancreatic enzyme secretion. *J Clin Invest* 1993; 92: 418-424.

Li Y, Owyang C. Endogenous cholecystokinin stimulates pancreatic enzyme secretion via vagal afferent pathway in rats. *Gastroenterology* 1994; 107: 525-531.

Li Y, Hao Y, Owyang C. evidence for autorregulation of cholecystokinin secretion

during diversion of bile pancreatic juice in rats. *Gastroenterology* 1995; 109: 231-238.

Li Y, Hao Y, Owyang C. High-affinity CCK-A receptors on the vagus nerve mediate CCK-stimulated pancreatic secretion in rats. *Am J Physiol* 1997; 273: G679-G685.

Liddle RA. Cholecystokinin cells. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 221-242.

Lancaster JR. Stimulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8137-8141.

Liu MT, Kirchgessner AL. Guinea pig pancreatic neurons: morphology, neurochemistry, electrical properties, and response to 5-HT. *Am J Physiol* 1997; 273: G1273-G1289.

M

Malagelada J-R, Go VLW, Summerskill WHJS. Altered pancreatic and biliary function after vagotomy and pyloroplasty. *Gastroenterology* 1974; 66: 22-27.

Malinski T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature Lond* 1992; 358: 676-678.

Maouyo D, Guan D, Rivard N, Adelson JW, Morisset J. Stability of circadian and minor cycles of exocrine pancreatic secretion in atropine- and MK-329-infused rats. *Am J Physiol* 1995; 268: G251-G259.

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268: 12231-12234.

Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232: 708-716.

Martling CR. sensory nerves containing tackinins and cGRP in the lower airways. *Acta Physiol Scand Suppl* 1987; 563: 1-57.

Molero X, Guarner F, Salas A, Mourelle M, Puig V, Malagelada J-R. Nitric oxide modulates pancreatic basal secretion and response to cerulein in the rat: effects in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1995; 108: 1855-1862.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1709-1715.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.

Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL. L-N^G-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 198-202.

Moore PK, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptives and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol* 1993a; 110: 219-224.

Moore PK, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL. 7-nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits antinociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol* 1993b; 110: 296-297.

Moriarty P, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ. Characterization of cholecystokinin A and cholecystokinin B receptors expressed by vagal afferent neurons. *Neuroscience* 1997; 79: 905-913.

Moro MA, Russel RJ, Cellek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-USmar VM, Radomski MW, Moncada S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 1480-1485.

Moore PK, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL, Babbedge RC. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 219-224.

Moore PK, Handy RLC. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase-is NOS really good NOS for the nervous system? *TIPS* 1997; 18: 204-211.

Muallem S. Calcium transport pathways of pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol* 1989; 51: 83-105.

Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M, Conklin JL. The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor function in humans. *Gastroenterology* 1995; 109: 1241-1248.

N

Nagain C, Galas MC, Lignon MF, Rodríguez M, Martínez J, Rozé C. Synthetic CCK8 analogs with antagonist activity on pancreatic receptors: in vivo study in the rat, compared to non-peptidic antagonist. *Pancreas* 1991; 6: 275-281.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-3064.

Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 13725-13728.

Nelson MT, Debas HT, Mulvihill SJ. Vagal stimulation of rat exocrine pancreatic secretion occurs via multiple mediators. *Gastroenterology* 1993; 105: 221-228.

Niederau M, Niederau C, Strohmeyer G, Grendell JH. Comparative effects of CCK receptor antagonists on rat pancreatic secretion in vivo. *Am J Physiol* 1989;256:G150 - G157.

Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 171-178.

O

O'Konski MS, Pandol SJ. Effects of caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell. *J Clin Invest* 1990; 86: 1649-1657.

O'Rourke MF, Reidelberger RD, Solomon TE. Effect of CCK antagonist L364718 on meal-induced pancreatic secretion in rats. *Am J Physiol* 1990; 258: G179-184.

Otsuki M, sakamoto Ch, Yuu H, maeda M, Morita S, Ohki A, Kobayashi N, Terashi K, Okano K, Baba S. Discrepances between the doses of cholecystokinin or caerulein-stimulating exocrine and endocrine responses in perfused isolated rat pancreas. *J Clin Invest* 1979; 63: 478-484.

Owyang C, Williams J. Pancreatic secretion. En: Yamada LR (ed.). *Textbook of Gastroenterology*. Segunda edición. Philadelphia, J.B. Lippicott Company. 1995 (1): 361-383.

Owyang C. Physiological mechanisms of cholecystokinin action on pancreatic secretion. *Am J Physiol* 1996; 271: G1-G7.

P

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.

Pandol SJ, Schoeffield MS. 1,2-diacylglycerol, protein kinase C, and pancreatic enzyme secretion. *J Biol Chem* 1986; 261: 4438-4444.

Pandol SJ, Schoeffield-Payne MS. Cyclic GMP mediates the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem* 1990; 265: 12846-12853.

R

Radomski MW, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost* 1993 ; 70: 36-41.

Radomski MW, Zakar T, Salas E. Nitric oxide in platelets. *Methods Enzymol* 1996; 269: 88-107.

Raibould HE, Taché Y. Cholecystokinin inhibits gastric motility and emptying via a capsaicin-sensitive vagal pathway in rats. *Am J Physiol* 1988; 255: G242-G246.

Rand MJ, Li CG. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 659-682.

Rattan S, Rosenthal GJ, Chakder S. Human recombinant hemoglobin (rHb1.1) inhibits nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerve-mediated relaxation of internal anal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 1211-1216.

Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3375-3378.

Rief DW, Simmons RD. Nitric oxide mediates iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys* 1990; 283: 537-541.

Rowley WH, Satos S, Huang SC, Collado-Escobar DM, Beaven MA, Wang LH, Martínez J, Gardner JD, Jensen RT. Cholecystokinin-induced formation of inositol phosphates in pancreatic acini. *Am J Physiol* 1990; 259: G655-G665.

S

Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 1992, 262: G379-G392.

Schmidt HHHW, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 78: 919-925.

Sharkey KA, Williams RG, Dockray GJ. Sensory substance P innervation of the stomach and pancreas. Demonstration of capsaicin-sensitive sensory neurons in the rat by combined immunohistochemistry and retrograde tracing. *Gastroenterology* 1984; 87: 914-921.

Shimosegawa T, Abe T, Satoh A, Asakura T, Yoshida K, Koizumi M, Toyota T. Histochemical demonstration of NADPH-diaphorase activity, a marker for nitric oxide synthase, in neurons of the rat pancreas. *Neurosci Lett* 1992; 148: 67-70.

Solomon TE. Control of exocrine pancreatic secretion. En: Johnson LR (ed.). *Physiology of the gastrointestinal tract*. Tercera edición. New York, Raven Press, 1994 (2): 1499-1529.

Somers M, Piqueras AI, Strange K, Zeidel ML, Pfaller W, Gawryl M, Harris HW. Interactions of ultrapure bovine hemoglobin with renal epithelial cells in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 1997; 273: F38-F52.

Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 383-394.

Stamler JS. S-nitrosothiols and biorregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1995; 196:19-36.

Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Valeri CR, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl acad Sci USA* 1992a; 89: 7674-7677.

Stamler JS, Jaraki O, Osborne JA, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel DJ, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl acad Sci USA* 1992b; 89: 7674-7677.

Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan C, Griffith O, Feldman P, Wiseman J. NO-Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 1991; 266: 6259-6263.

Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca⁺⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-triphosphate. *Nature* 1983; 306: 67-69.

Sung CK, Hootman SR, Stuenkel EL, Kuroiwa C, Williams JA. Downregulation of protein kinase C in guinea pig pancreatic acini: effects on secretion. *Am J Physiol* 1988; 254: G242-G248.

T

Thompson A, McGarry AE, Valeri CR, Lieberthal W. Stroma-free hemoglobin increases blood pressure and GRF in the hypotensive rat: role of nitric oxide. *J Appl Physiol* 1994; 77: 2348-54.

V

Volpe P, Krause KH, Hashimoto S, Zorzato F, Pozzan T, Meldolesi J, Lew DP. "Calciosome", a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive-Ca²⁺ store of non muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1091-1095.

W

Wang YX, Poon CL, Pang CCY. *In vitro* and *ex vivo* inhibitory effects of L and D-enantiomers of N^G-nitro-arginine on endothelium-dependent relaxation of rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265: 112-119.

Werner J, Rivera J, Fernandez-del Castillo C, Lewandrowski K, Adrie C, Rattner DW, Warshaw AL. Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute edematous versus necrotizing pancreatitis. *Surgery* 1997; 121: 23-30

Wood J, Garthwaite J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signaling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 1994; 33: 1235-1244.

Wolff DJ, Lubeskie A, Umansky C. The inhibition of the constitutive bovine endothelial endothelial nitric oxide synthase by imidazole and indazole agents. *Arch Biochem biophys* 1994; 314: 360-366.

Y

Yoshida H, Tsunoda Y, Owyang C. Effect of uncoupling NO/cGMP pathways on carbachol- and CCK-stimulated Ca^{2+} entry and amylase secretion from the rat pancreas. *Pflügers Arch* 1997; 434: 25-37.

Yule DI, Williams JA. Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus. En: Johnson LR (ed.). *Physiology of the gastrointestinal tract*. Tercera edición. New York, Raven Press, 1994 (2):1447-1472.

Z

Zarbin MA, Wamsley JK, Innis RB, Kuhar MJ. Cholecystokinin receptors: presence and axonal flow in the rat vagus nerve. *Life Sci* 1981; 29: 697-705.