

Tesis Doctoral

El Factor Natriurético Atrial en el páncreas exocrino: papel en eventos tempranos que conducen al desarrollo de pancreatitis aguda

Najenson, Ana Clara

2016-05-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Najenson, Ana Clara. (2016-05-30). El Factor Natriurético Atrial en el páncreas exocrino: papel en eventos tempranos que conducen al desarrollo de pancreatitis aguda. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Najenson, Ana Clara. "El Factor Natriurético Atrial en el páncreas exocrino: papel en eventos tempranos que conducen al desarrollo de pancreatitis aguda". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-05-30.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“El Factor Natriurético Atrial en el páncreas exocrino: papel en eventos tempranos que conducen al desarrollo de pancreatitis aguda”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el Área de Ciencias Biológicas

Autora: Ana Clara Najenson

Director: Prof. Dra. Liliana G. Bianciotti

Consejero de estudios: Prof. Dra. Haydée Viola

Lugar de trabajo: Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)

UBA-CONICET

Buenos Aires 2016

Fecha de defensa: 30/05/2016

EL FACTOR NATRIURETICO ATRIAL EN EL PÁNCREAS EXOCRINO: PAPEL EN EVENTOS TEMPRANOS QUE CONDUCEN AL DESARROLLO DE PANCREATITIS AGUDA

La pancreatitis aguda constituye una entidad nosológica prevalente caracterizada por la autodigestión del páncreas exocrino provocada por la activación *in situ* de las mismas enzimas que el páncreas produce. Se expresa como una forma leve autolimitada, o bien como una forma severa con elevada mortalidad principalmente como resultado de falla multiorgánica. Las causas y/o mecanismos que llevan a una u otra expresión son desconocidos, por lo que debido a su curso incierto constituye una preocupación clínica. Los eventos tempranos que conducen a su desarrollo no se hayan aún esclarecidos, si bien la activación del tripsinógeno y de la respuesta inflamatoria constituyen dos mecanismos disparadores independientes.

En este trabajo de tesis abordamos el estudio del posible papel protector del factor natriurético atrial (ANF) en los eventos temprano que disparan la patología, particularmente la respuesta inflamatoria que lleva a la muerte de las células acinares eventualmente por necrosis y apoptosis mediante la utilización de un modelo animal (rata) validado de pancreatitis aguda. Asimismo, evaluamos la posibilidad de que el páncreas exocrino constituya una fuente extracardíaca de ANF. El presente estudio se sustenta en trabajos previos en los que observamos que el ANF regula fisiológicamente la funcionalidad del páncreas exocrino y atenúa la pancreatitis aguda experimental al estimular la exclusión de AMPc a través de proteína asociada a resistencia a multidrogas tipo 4 (MRP4). No obstante, este mecanismo no explicaría en su totalidad el papel protector del ANF. Los resultados mostraron que el ANF disminuye la respuesta inflamatoria desencadenada durante la pancreatitis aguda al reducir la expresión de los principales mediadores inflamatorios. El ANF redujo la activación del factor de transcripción NF- κ B, íntimamente relacionado con la activación de genes que codifican para citoquinas pro-inflamatorias. En este

sentido, disminuyó asimismo los niveles intrapancreáticos del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), citoquina que juega un papel clave en la propagación de la respuesta inflamatoria. Por otra parte, disminuyó la expresión de enzimas inducibles durante la inflamación como la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y ciclo oxigenasa 2 (COX-2) así como también su principal producto, la prostaglandina E₂ (PGE₂). La atenuación de la respuesta inflamatoria se correlacionó con modificaciones de la ultraestructura de las células acinares observada mediante microscopía electrónica de transmisión. El ANF atenuó el daño generado en la ultraestructura celular ya que disminuyó el *swelling* del retículo endoplásmico, el edema intra e intercelular y la presencia de autofagolisosomas.

El ANF asimismo estimula la muerte celular por apoptosis y disminuye la necrosis, lo que constituye un efecto beneficioso, ya que en la pancreatitis aguda la apoptosis se correlaciona inversamente con la necrosis y así con la severidad de la patología. El ANF incrementa las células TUNEL positivas y la activación de las caspasas, lo que se relaciona la morfología de los núcleos observados por microscopía electrónica.

Se observó asimismo que el ANF se expresa en el páncreas exocrino tanto a nivel de su ARN mensajero como a nivel de proteína, lo que implica que el páncreas sintetiza y expresa ANF maduro. Mediante la técnica de inmuno-oro se observó que el ANF se localiza en el retículo endoplásmico, mitocondrias y gránulos de zimógeno.

En resumen, en este trabajo de tesis demostramos que el ANF atenúa la respuesta inflamatoria y estimula la apoptosis en la pancreatitis aguda experimental lo sustenta su papel protector en el desarrollo de la patología. Asimismo, observamos que el páncreas exocrino sintetiza y expresa ANF maduro, sugiriendo que tendría funciones paracrina y/o autocrina a nivel de las células acinares pancreáticas, en las que hemos demostrado la presencia de sus receptores.

Palabras clave: PANCREATITIS AGUDA – FACTOR NATRIURÉTICO ATRIAL – INFLAMACIÓN - APOPTOSIS

ATRIAL NATRIURETIC FACTOR IN THE EXOCRINE PANCREAS: ROLE IN THE EARLY EVENTS LEADING TO THE DEVELOPMENT OF ACUTE PANCREATITIS

Acute pancreatitis is a prevalent disease characterized by the pathologic autodigestion of the gland promoted by the digestive enzymes synthesized and secreted by the pancreas as a result of premature intra-pancreatic activation. The condition is usually mild and self-limiting, but in 10–15% of cases, it can be severe with associated multiorgan dysfunction and high mortality. The causes leading to one or other form of pancreatitis are presently unknown and due to its uncertain course, the disease still remains a clinical concern. The early events in the development of pancreatitis are not fully understood yet, although trypsinogen activation and the inflammatory response are two independent triggering mechanisms associated with the onset of the disease.

In the present thesis we investigated the possible protective role of atrial natriuretic factor (ANF) in the early events triggering acute pancreatitis, particularly the inflammatory response that leads to acinar cell death either by necrosis, apoptosis or both. We also evaluated the exocrine pancreas as a possible extra cardiac source of ANF production. The present study is based on previous works from our laboratory showing that ANF regulates pancreatic functionality and attenuates acute pancreatitis by stimulating cAMP extrusion through multidrug resistance associated protein type 4 (MRP4). However, this mechanism would partially explain ANF beneficial role in the disease.

Results showed that ANF attenuated the inflammatory response triggered in acute pancreatitis by reducing the expression and/or level of the major inflammatory mediators. ANF reduced the activation of the transcription factor NF- κ B, intimately involved in the stimulation of genes encoding pro-inflammatory cytokines. In this sense, ANF also diminished tumor necrosis factor α (TNF- α) intrapancreatic levels, a key cytokine involved in the propagation of the inflammatory response. The atrial factor also reduced the expression of inducible enzymes like

nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) and its main metabolite, prostaglandin E₂ (PGE₂). The attenuation of the inflammatory mediators correlated well with the ultrastructural changes observed in pancreatic acinar cells by transmission electron microscopy. ANF reduced acinar cell damage, it diminished endoplasmic reticulum swelling, intra and intercellular edema, and the presence of autophagosomes.

ANF also stimulated programmed cell death (apoptosis) and diminished necrosis, which is a beneficial effect, given that in acute pancreatitis apoptosis inversely correlates with necrosis and with the severity of the disease. ANF increased the number of positive TUNEL cells and caspases activation. These findings correlate well with the morphology of the nuclei observed by transmission electron microscopy.

In the present study it was also observed that ANF mRNA and protein are expressed in the exocrine pancreas, supporting that the gland synthesizes and expresses mature ANF. Immunogold labeling electron microscopy studies showed that ANF localizes to endoplasmic reticulum, mitochondria and zymogen granules.

In summary, this thesis shows that in experimental acute pancreatitis ANF attenuates the inflammatory response and stimulates apoptosis, supporting the protective role of this peptide in the development of the disease. Furthermore, the exocrine pancreas synthesizes and expresses mature ANF, suggesting that the atrial peptide may act in a paracrine and/or autocrine fashion on the acinar cells where we have previously reported the presence of natriuretic factor receptors expression.

Key words: ACUTE PANCREATITIS- ATRIAL NATRIURETIC FACTOR-
INFLAMMATION- APOPTOSIS

A Liliana por darme la oportunidad y confiar en mi trabajo. Por asesorarme, guiarme y ayudarme.

Al Dr. Héctor Targovnik y a todos los miembros de la Cátedra de Genética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) y el INIGEM, por apoyarme y acompañarme día a día, y hacerme sentir en mi lugar.

Al Dr. Vatta y a la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) por el espacio y la ayuda brindada.

A las Dras. Costas y Rubio del Instituto Lanari por la ayuda y la buena energía recibida tantas veces...

A los Dres. Casco y Bianchi por la ayuda y el asesoramiento tan pacientemente otorgado. A Mariana por la compañía...

A la Dra. Mohn y a toda la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Odontología (UBA) por la ayuda recibida.

Al Dr. Perazzo por tanta tanta ayuda y acompañamiento.

A los Dres. Mottino y Cherñavsky por acompañar el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Viola por la ayuda otorgada.

A las instituciones que hicieron posible este trabajo: El Instituto INIGEM y la Cátedra de Fisiología (FFyB-UBA) por el espacio y al CONICET, ANPCyT y la UBA por el financiamiento. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

A mis amigas y compañeras diarias, Myr, Ani, Masi y Juli G.

A Juli R por contagiarme su entusiasmo y compromiso por el trabajo.

A mis amigas que están siempre.

A Caro, a Becky y Benji! A José y Cande.

A Lu, Ale y Juan...

Y muy especialmente a mi mamá y a Diegui.

Los resultados de la presente tesis fueron presentados en forma parcial en los siguientes eventos científicos:

- “ATRIAL NATRIURETIC FACTOR (ANF) IS SYNTHESIZED IN THE RAT EXOCRINE PANCREAS” Ana Clara Najenson; MR Rodríguez; M Bianchi; V Casco; MS Vatta; LG Bianciotti. Annual Meeting at Experimental Biology. Boston, MA (USA). Abril, 2015. The FASEB Journal Vol. 29 No. 1 Supplement 856.1 2015

- “PROTECTIVE ROLE OF ATRIAL NATRIURETIC FACTOR (ANF) IN ACUTE PANCREATITIS” Ana Clara Najenson, MS Ventimiglia, JC Perazzo, MS Vatta, LG Bianciotti 1st Pan-American Congress of Physiological Sciences. Iguassu Falls-Brazil. August 2014.

- “EL FACTOR NATRIURETICO ATRIAL ES SINTETIZADO EN EL PANCREAS EXOCRINO DE RATA” Ana Clara Najenson; MR Rodríguez; M Bianchi; V Casco; MS Vatta; LG Bianciotti. LIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica - LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Ciudad de Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Noviembre, 2014. Medicina (ISSN 0025-7680) Vol. 74 Supplement. III – 2014

-” EFECTO PROTECTOR DEL FACTOR NATRIURÉTICO ATRIAL EN LOS EVENTOS TEMPRANOS DE LA PANCREATITIS AGUDA EN LA RATA” Ana Clara Najenson, MS Ventimiglia, F Rubio, M Costas, MS Vatta, C Davio, LG Bianciotti. LVIII Reunión Anual de la Sociedad de Investigación Clínica - XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología- XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Ciudad de Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentine. Noviembre, 2013. Medicina (ISSN 0025-7680) Vol. 73 Supplement III - 2013

-“EL FACTOR NATRIURETICO ATRIAL (ANF) ATENUA EL DESARROLLO DE PANCREATITIS AGUDA EN LA RATA” Ana Clara Najenson, MS Ventimiglia, JC Perazzo, N Lago, MS Vatta, C Davio, LG Bianciotti. LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica – LX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Ciudad de Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Noviembre, 2012. Medicina (ISSN 0025-7680) Vol. 72 Supplement II - 2012

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	4
1- EL PÁNCREAS.....	4
1.1- Características generales	4
1.2 El páncreas exocrino	6
1.4- Regulación de la secreción pancreática.....	11
1.5- Regulación de la secreción pancreática durante la ingesta.....	14
2- EL FACTOR NATRIURÉTICO ATRIAL	15
2.1- Estructura, síntesis y liberación de ANF.....	16
2.2- Receptores de los péptidos natriuréticos.....	19
2.3- Funciones biológicas del ANF.....	22
2.4- ANF y el páncreas exocrino	24
3- LA PANCREATITIS AGUDA	25
3.1- Etiología y epidemiología.....	26
3.2- Fisiopatología.....	28
3.3- Modelos animales de pancreatitis aguda	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
Objetivos específicos.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1- Animales	44
2- Diseño experimental	44
3- Métodos	46
3.1- Determinación de la actividad de la amilasa plasmática	46
3.2- Cuantificación de proteínas.....	46
3.3- Ensayos de Western Blot	47
3.4- Obtención de fracciones nucleares.....	48
3.5- Determinación de los niveles intrapancreáticos y plasmáticos de TNF- α	50
3.6- Determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa.....	51
3.7- Determinación de los niveles de prostaglandina E ₂ (PGE ₂) intrapancreática	52
3.8- Determinación de la actividad de las enzimas caspasas.....	53
3.9- Obtención de acinos pancreáticos aislados	54

3.10- Extracción de ARN total y transcripción reversa.....	55
3.11- Técnica de PCR	55
3.12- Obtención de cortes histológicos para microscopia óptica y de fluorescencia	56
3.12a- Microscopía de Inmunofluorescencia	56
3.12b- Técnica de TUNEL.....	57
3.13- Obtención de cortes histológicos para estudios microscopia electrónica	58
3.13a- Estudios de ultraestructura.	58
3.13b- Inmuomarcación con partículas de oro coloidal.....	59
4- Análisis estadístico	60
RESULTADOS.....	60
1- EFECTOS DEL ANF SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA PANCREATITIS AGUDA	61
1.1- El ANF reduce la translocación a núcleo del factor de transcripción NF-kB.....	61
1.2- El ANF disminuye los niveles intrapancreáticos de TNF- α	64
1.3- El ANF reduce la activación de ERK 1/2	65
1.4- El ANF disminuye la expresión de la enzima COX-2.....	66
1.5- EL ANF reduce los niveles intrapancreáticos de PGE ₂	68
1.6- El ANF disminuye la expresión de la enzima iNOS	69
1.7- El ANF modula la expresión del factor de transcripción PPAR γ	70
1.8- El ANF disminuye la activación de la enzima MPO	71
2- EFECTOS DEL ANF SOBRE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS EN LA PANCREATITIS AGUDA.....	73
2.1- El ANF aumenta la presencia de núcleos apoptóticos en la pancreatitis aguda	73
2.2- El ANF induce la activación de caspasa 3 en la pancreatitis aguda	76
2.3- El ANF y la actividad de la caspasas 8, 9 y 2 en la pancreatitis aguda	79
3- ANÁLISIS DE LA ULTRAESTRUCTURA DEL PÁNCREAS	82
4- EL PÁNCREAS EXOCRINO COMO FUENTE DE ANF	93
4.1- El páncreas exocrino de rata expresa el ARNm de ANF.....	93
4.2- El páncreas exocrino expresa ANF maduro.....	94
4.3- El ANF se localiza en el citoplasma de las células acinares	95
4.4- El ANF se localiza en gránulos de zimógeno y retículo endoplásmico.....	96
4.5- El receptor NPR-C se localiza en la región basolateral de los acinos pancreáticos.....	98
DISCUSIÓN.....	97
PERSPECTIVAS.....	121
BIBLIOGRAFÍA.....	122

Las abreviaturas utilizadas en esta tesis fueron las siguientes:

AC: adenilato ciclasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPc: monofosfato cíclico 3', 5' de adenosina

ANF: factor natriurético atrial (*atrial natriuretic factor*)

ARN: ácido ribonucleico

BNP: péptido natriurético tipo B (*B-type natriuretic peptide*)

BSA: sueroalbúmina bovina

CCK: colicistoquinina

CCK1 o CCKA: receptor CCK A o tipo 1

CCK2 o CCKB: receptor CCK B o tipo 2

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Receptor

CNP: péptido natriurético tipo C (*C-type Natriuretic Peptide*)

COX-1: ciclooxigenasa 1

COX-2: ciclooxigenasa 2

CPRE: colangiopancreatografía retrógrada endoscópica

CTAB: bromuro de hexadecilmetilamonio

DAG: 1,2-diacilglicerol

DAMPs: *Damage-Associated Molecular Pattern Molecules*

ELISA: enzimoimmunoensayo de adsorción

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

ERK 1/2: *Signal-Regulated Kinases 1/2*

GC: guanilato ciclase

GI: gastrointestinal

GMPc: monofosfato cíclico 3', 5' de guanosina

GPCRs: receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled receptors*)

GRP: péptido liberador de gastrina

GTP: guanosina trifosfato

IL-1 β : interleukina 1 β

IL-6: interleukina 6

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

ip: intraperitoneal

IP₃: 1,4,5-trifosfato

JNK 1/2/3: *c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3*

M1: receptor muscarínico 1

M2: receptor muscarínico 2

MAPKs: mitogen-activated protein kinases

MET: microscopia electrónica de transmisión

MPO: mieloperoxidasa

MRPs: proteínas de resistencia a multidroga (*multidrug resistance proteins*)

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

NO: óxido nítrico

NPR-A: receptor de péptidos natriuréticos tipo A (*natriuretic peptide receptor-A*)

NPR-B: receptor de péptidos natriuréticos tipo B (*natriuretic peptide receptor-B*)

NPR-C: receptor de péptidos natriuréticos tipo C (*natriuretic peptide receptor-C*)

PARP-1: poly (ADP-ribose) polymerase-1

PBS: buffer fosfato (*phosphate buffer solution*)

PDEs: fosfodiesterasas

PGs: prostaglandinas

PGE₂: prostaglandina E₂

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PKG I: proteína quinasa dependiente de GMPc tipo I

PKG II: proteína quinasa dependiente de GMPc tipo II

PLC γ : fosfolipasa C γ

PPAR γ : peroxisome proliferator- activated receptor- γ

RE: retículo endoplasmático

RIA: radioinmunoensayo

ROS: especies reactivas del oxígeno

SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptors

SPINK1: enzima inhibidora del tripsinógeno (*serine protease inhibitor Kazal 1*)

TBS: buffer tris-salino (*tris-buffered saline*)

TBS-T: buffer tris-salino con tween 20

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TNRF-1: receptor de TNF- α 1

TNRF-2: receptor de TNF- α 2

VIP: péptido intestinal vasoactivo

VPAC1: receptor del péptido intestinal vasoactivo tipo 1

VPAC2: receptor del péptido intestinal vasoactivo tipo 2

1- EL PÁNCREAS

1.1- Características generales

El páncreas es una glándula mixta de localización retroperitoneal por detrás del estómago y a la altura de las vértebras L1-L3 (*Figura 1*). Se divide macroscópicamente en cuatro zonas: la cabeza y el proceso unciforme, el cuello, el cuerpo y la cola. La cabeza y el proceso unciforme se orientan hacia la derecha ubicándose en la concavidad del duodeno. La cola se orienta hacia la izquierda, en contacto con la región anterior del bazo mientras que el cuerpo se ubica posterior a la región distal del estómago (*Figura 1*). El páncreas está rodeado por una fina capa de tejido conectivo que se invagina dividiéndola en pequeños lóbulos (*Gorelick y Jamienson, 1987*).

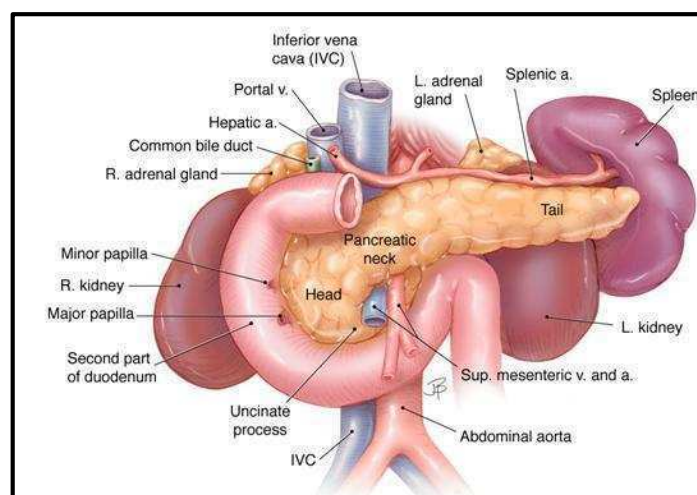
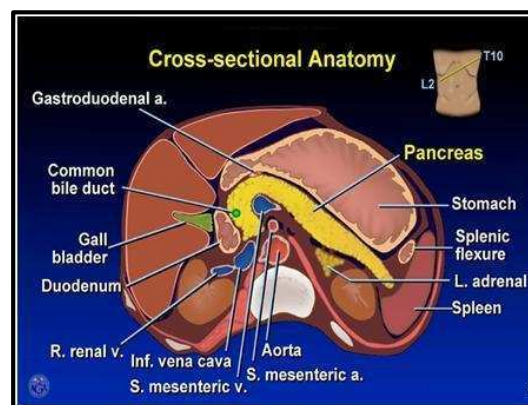


Figura 1: Localización el páncreas. Panel izquierdo: Corte transversal del abdomen a la altura de las vértebras T10 y L2. Panel derecho: Esquema representativo de la posición de las distintas regiones del páncreas (*Hruban y col, 2007*).

El páncreas recibe irrigación del tronco celíaco y la arteria mesentérica superior, ramas de la aorta abdominal. La anastomosis de las ramas de estos vasos asegura el suministro de sangre arterial al páncreas. Las venas pancreáticas drenan en las venas esplénicas y mesentérica superior, las que luego se unen para originar la vena porta (*Pandol y col, 2015*). A su vez, una red de vasos linfáticos recorre el páncreas a través del tejido conectivo interlobular, en íntimo contacto con los vasos sanguíneos. En condiciones normales, los vasos linfáticos drenan el exceso de líquido intersticial, manteniendo la homeostasis del órgano (*O'Morchoe y col, 1997*).

El sistema nervioso autónomo inerva el páncreas a través del sistema simpático, mediante los plexos celíaco, mesentérico superior y hepático, como a través del sistema parasimpático, por medio del nervio vago (*Gorelick y Jamienson, 1987*). El sistema nervioso autónomo controla la funcionalidad del páncreas mediante la liberación de neurotransmisores como acetilcolina y noradrenalina, así como también de neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la sustancia P, bombesina y el péptido liberador de gastrina (GRP), entre otros (*De Giorgio y col, 1992*).

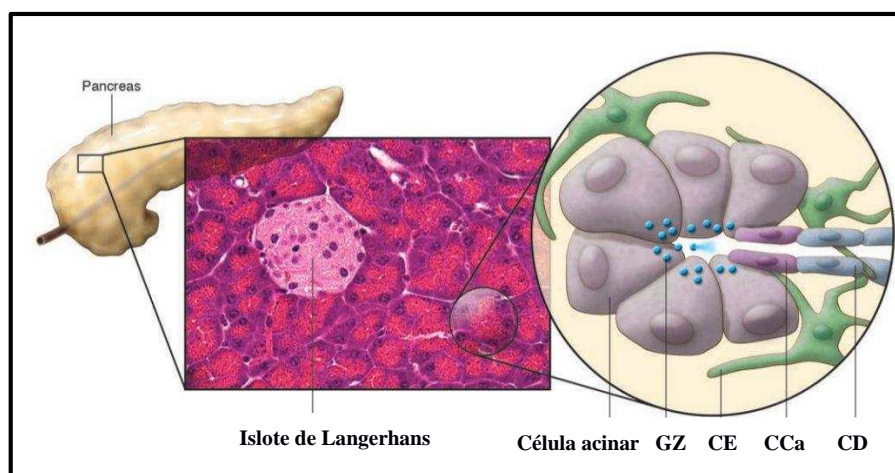


Figura 2: Histología del páncreas. Corte histológico del páncreas endocrino y exocrino (izquierda) y representación esquemática de las células que conforman el páncreas exocrino (derecha): GZ: Gránulos de zimógeno; CE: Célula estrellada; CCa: Célula centroacinar; CD: Célula ductal (Adaptado de *Omary y col, 2007*).

El páncreas es una glándula mixta, con funciones endocrinas y exocrinas. La porción endocrina representa el 1-2% de la masa total y está constituida por los islotes de Langerhans formados por distintos tipos celulares: las células β productoras de insulina, las células α que sintetizan glucagón, las células δ que producen somatostatina y las células F productoras de polipéptido pancreático, péptidos que regulan el metabolismo intermedio y la función digestiva. Los islotes, distribuidos por todo el tejido pancreático, están rodeados por las células acinares y ductales. La porción exocrina del páncreas produce y secreta al duodeno el jugo pancreático, que contiene enzimas digestivas y bicarbonato, esencial para la absorción de los distintos nutrientes de la ingesta. El páncreas exocrino representa el 95% de la masa del órgano y está formado por células acinares, células ductales, células centroacinares y células estrelladas (*Figura 2*) (*Chandra y Liddle, 2015*).

1.2 El páncreas exocrino

La porción exocrina del páncreas es una estructura túbulo-acinar, formada principalmente por células acinares y ductales. Las células acinares se organizan formando la unidad funcional del páncreas exocrino denominada acino. Los acinos pancreáticos se conectan a un sistema de túbulos o ductos formados por las células ductales (*Figura 2*). Los conductos acinares se continúan en los ductos intralobulares o túbulos intercalares, los que, a su vez, drenan en los conductos interlobulares, que dan origen al conducto pancreático principal denominado conducto de Wirsung. El conducto de Wirsung atraviesa el páncreas horizontalmente desde la cola a la cabeza, desembocando en el duodeno a través de la ampolla de Vater en humanos y en el conducto hepático común en roedores. Así, las células acinares secretan enzimas digestivas en un medio rico en bicarbonato producido por las células ductales y centroacinares, y esta secreción fluye por los conductos acinares, pasando por los intra e interlobulares hasta llegar al conducto de Wirsung que la verterá al duodeno (*Figura 3*). El 10% de la población humana presenta un conducto accesorio

denominado conducto de Santorini (Pandol y col, 2015).

Las células centroacinares y las estrelladas constituyen los otros dos tipos celulares del páncreas exocrino. Las células centroacinares, similares morfológicamente a las células ductales, se ubican entre las células acinares y las ductales (Chandra y Liddle, 2015; Pandol y col, 2015) (Figura 2). Las células estrelladas, localizadas alrededor de los acinos, las células ductales o los islotes de Langerhans, participan en el crecimiento y proliferación de estructuras epiteliales (Omary y col, 2007).

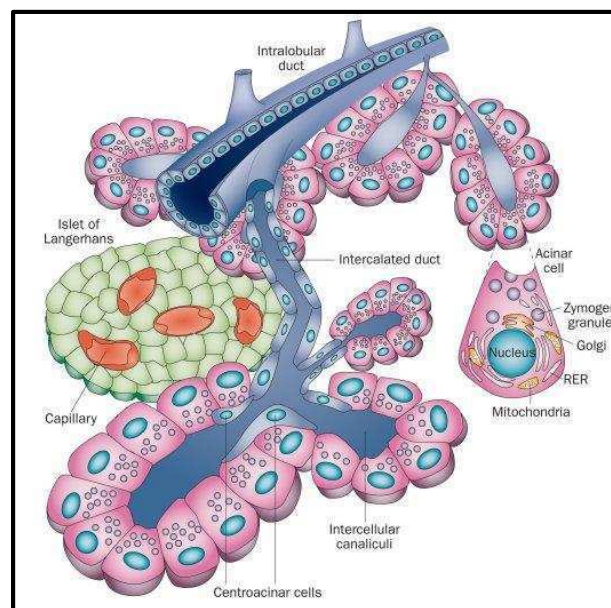


Figura 3: Esquema de la arquitectura del páncreas exocrino. Se observan los acinos pancreáticos y el sistema de conductos que vehiculizan la secreción producida por las células acinares (Ver texto para mayor detalle) (Logsdon y Ji, 2013).

1.3 Secreción pancreática

La principal función del páncreas exocrino consiste en producir y secretar el jugo pancreático al duodeno, fundamental para la correcta digestión y absorción de los nutrientes provenientes de la ingesta. El jugo pancreático está conformado por una fracción acuosa y otra enzimática. La fracción enzimática está representada por distintas enzimas digestivas sintetizadas, almacenadas y secretadas por las células acinares, tipo celular que posee la mayor tasa de síntesis

proteica de todas las células del organismo de mamíferos. La fracción acuosa, rica en agua y bicarbonato, vehiculiza las enzimas al duodeno y provee el pH óptimo para que puedan fragmentar las macromoléculas para su posterior absorción.

En el acino pancreático cada célula acinar se orienta con su membrana basolateral hacia la periferia y la membrana apical hacia el espacio luminal, que se continúa con los ductos acinares (*Figura 3*). Debido a la alta demanda de síntesis proteica, la célula acinar posee abundante retículo endoplasmático (RE), dispuesto alrededor del núcleo, que se orienta hacia la membrana basolateral. Las enzimas digestivas sintetizadas en el RE son almacenadas como precursores enzimáticos inactivos en los gránulos de zimógeno ubicados en la zona apical de la célula (*Figura 4*). En situaciones fisiopatológicas, como la pancreatitis aguda, la arquitectura celular del páncreas sufre importantes alteraciones que serán discutidas en otro apartado (*Dolai y col., 2012*).

Las enzimas sintetizadas por la célula acinar se categorizan en 4 grupos: enzimas proteolíticas (tripsina, quimiotripsina y carboxipeptidasas), enzimas amilolíticas (α -amilasa pancreática), enzimas lipolíticas (lipasa) y nucleasas. Las enzimas, a excepción de amilasa y lipasa, se almacenan como pro-enzimas inactivas o zimógenos dentro de los gránulos, mecanismo que evita que se activen *in situ*. Asimismo, el interior de los gránulos de zimógeno es ácido, evitando la actividad intrapancreática de las enzimas que requieren de un pH neutro para un óptimo funcionamiento. Además de almacenar las enzimas como precursores dentro de vesículas ácidas, la célula acinar sintetiza la serina proteasa inhibidora Kazal tipo 1 (SPINK1, del inglés *serine protease inhibitor, Kazal type 1*), que inhibe la activación del tripsinógeno a tripsina, enzima que activa en cascada el resto de los precursores enzimáticos (*Whitcomb y col., 2003; Chandra y col., 2015; Pandol y col., 2015*). La célula acinar secreta el contenido de los gránulos de zimógeno por exocitosis apical. Las enzimas pancreáticas, sus sustratos y función se detallan en la *Tabla I*.

Las células ductales son responsables de producir mayoritariamente la fracción acuosa rica en bicarbonato del jugo pancreático, necesaria para neutralizar el quimo ácido proveniente del

estómago y así generar un ambiente óptimo para la actividad de las enzimas digestivas en el duodeno. La anhidrasa carbónica presente en la célula ductal convierte dióxido de carbono en bicarbonato y protón, mientras que un co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ localizado en su membrana basolateral incrementa los niveles de bicarbonato intracelular (*Figura 5*). El bicarbonato es transportado al espacio luminal por el transportador CFTR (del inglés, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), ubicado en la membrana apical. A su vez, el agua es arrastrada al espacio luminal por la fuerza iónica generada por el bicarbonato. De esta forma, el fluido producido por las células ductales vehiculiza las enzimas secretadas por las células acinares a través del sistema ductal hasta el duodeno (*Pandol, 2015*).

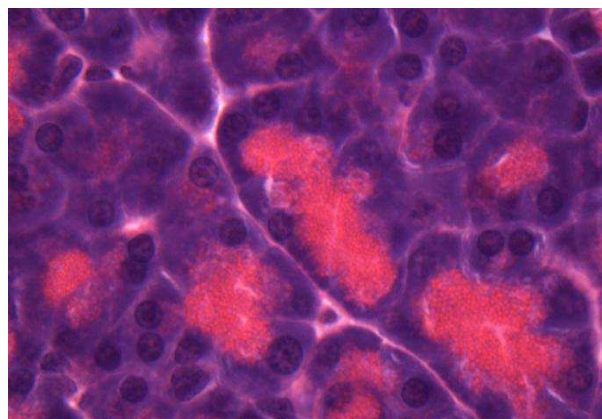
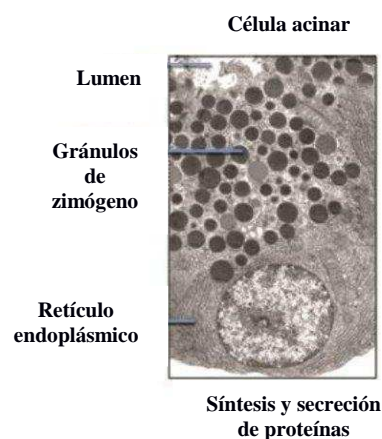


Figura 4: Estructura y ultraestructura de las células acinares. Panel superior: Ultraestructura de una célula acinar. Adaptado de “Pancreatic physiology, pathophysiology, acute and chronic pancreatitis. Gastrointestinal Teaching Project, American Gastroenterologic Association” (*Gorelick y col., 2003*). Panel inferior: Microscopía óptica de los acinos pancreáticos (400X) (*Ventimiglia y col., 2015*).

Enzima	Proenzima	Activador	Sustrato	Función catalítica
α-Amilasa	-	Calcio	Almidón, glucógeno	Amilolítica-endoamilasa
Lipasa	-	Calcio	Triglicéridos	Lipolítica-estearasa
Carboxil-ester-hidrolasa	-	-	Esteres carboxílicos	Lipolítica-estearasa
Colesterol-estearasa	-	-	Esteres de colesterol	Lipolítica-estearasa
Fosfolipasa A	Profosfolipasa	Tripsina	Fosfoglicéridos (lecitina)	Lipolítica-estearasa
Tripsina	Tripsinógeno	Enteroquinasa	Proteínas-polipéptidos	Proteolítico-endeopeptidasa
Quimiotripsina	Quimiotripsinógeno	Tripsina	Proteínas-polipéptidos	Proteolítico-endeopeptidasa
Elastasa	Proelastasa	Tripsina	Elastina	Proteolítico-endeopeptidasa
Colagenasa	-	-	Colágeno	Proteolítico-endeopeptidasa
Calicreína C	Calicreinógeno	-	Proteínas-polipéptidos	Proteolítico-endeopeptidasa
Carboxipeptidasa A y B	Procarboxipeptidasa	Tripsina	Proteínas-polipéptidos	Proteolítica-exopeptidasa
Leucina-aminopeptidasa	-	-	Proteínas-polipéptidos	Proteolítica-exopeptidasa
Ribonucleasa	-	-	ARN	Nucleolítica-endonucleasa
Desoxirribonucleasa	-	-	ADN	Nucleolítica-endonucleasa

Tabla I: Enzimas pancreáticas. En la tabla se listan las enzimas sintetizadas por la célula acinar, sus activadores y sustratos específicos, así como también su función.

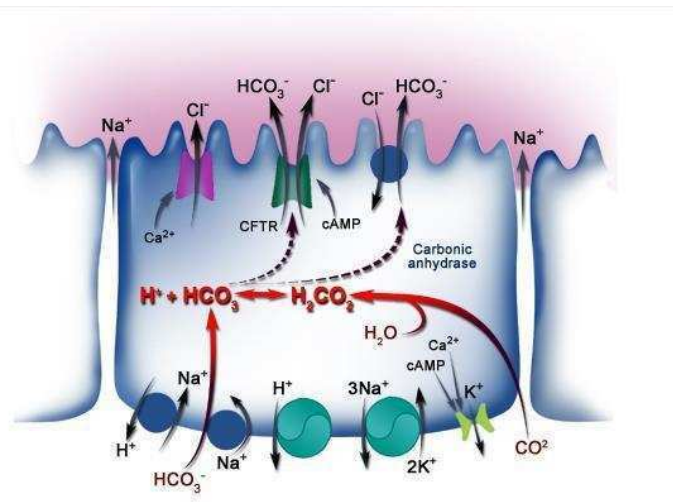


Figura 5: Generación de la fracción acuosa del jugo pancreático. Mecanismo de producción de agua y bicarbonato en la célula ductal (Ver texto para mayor detalle). Adaptado de “Pancreatic physiology, pathophysiology, acute and chronic pancreatitis. Gastrointestinal Teaching Project, American Gastroenterologic Association” (Gorelick y col., 2003).

Al llegar la secreción pancreática al lumen duodenal, la enteroquinasa, enzima sintetizada por los enterocitos, cataliza la activación del tripsinógeno a tripsina por remoción del extremo N-terminal de la enzima. La tripsina autocataliza su propia activación e inicia la cascada de activación del resto de las enzimas digestivas (Figura 6).

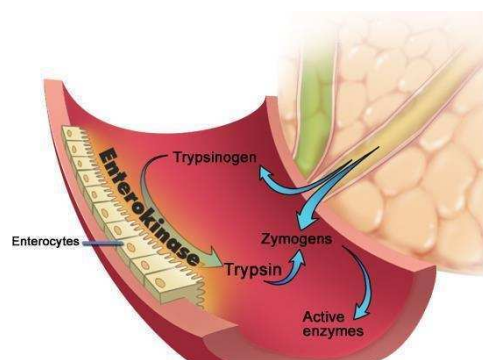


Figura 6: Activación de las enzimas pancreáticas en el lumen intestinal. El tripsinógeno en el lumen intestinal es activado por la enzima enteroquinasa a tripsina, lo que promueve la activación en cascada del resto de las enzimas digestivas. Adaptado de Pancreatic physiology, pathophysiology, acute and chronic pancreatitis. Gastrointestinal Teaching Project, American Gastroenterologic Association” (Gorelick y col., 2003).

1.4- Regulación de la secreción pancreática

La regulación de la secreción pancreática es un complejo proceso en el que intervienen en forma coordinada el sistema nervioso autónomo (sistema parasimpático), hormonas digestivas

y péptidos o neuropéptidos a su vez regulados por el sistema nervioso central a nivel del complejo dorsal del vago localizado en el tallo encefálico.

La regulación nerviosa está mediada por el sistema parasimpático a través del nervio vago que estimula la secreción acinar mediante la liberación de acetilcolina y los neuropéptidos VIP, GRP, sustancia P y bombesina, entre otros. La regulación hormonal está representada por las hormonas colicistoquinina (CCK) y secretina liberadas ante diversos estímulos por las células intestinales I y S, respectivamente (*Williams, 2001*).

Los principales secretagogos pancreáticos actúan a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G protein-coupled receptors*) ubicados en la membrana basolateral de las células, si bien también se han descrito receptores intracelulares (*Williams, 2001*). La acetilcolina y CCK actúan a través de receptores acoplados a proteínas G de la subfamilia Gq, cuya estimulación incrementa los niveles intracelulares de calcio, mientras que la secretina y VIP actúan a través de receptores acoplados a Gs, cuya estimulación activa la enzima adenilato ciclasa aumentando el AMPc intracelular. Por lo expuesto se deduce que el calcio y el AMPc constituyen los principales segundos mensajeros involucrados en la estimulación de la secreción pancreática como se esquematiza en el *Figura 7*.

Se han descrito dos receptores para CCK: el receptor CCK1 (antes denominado CCK-A) y el receptor CCK2 (antes denominado CCK-B). CCK1 es específico para CCK, mientras que CCK2 también presenta alta afinidad por gastrina. El receptor más estudiado es CCK1 ya que es el predominante en las células acinares de roedores, mientras que CCK2 es el principal receptor en humanos. Estos receptores también se encuentran en la musculatura lisa, estómago y cerebro, entre otros tejidos (*Williams y Blevins, 1993; Wank, 1998*). La estimulación de los receptores de CCK activan la enzima fosfolipasa C γ (PLC γ) que induce hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) a 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). IP₃, a su vez, libera calcio de las reservas del RE mientras que DAG activa la proteína quinasa C (PKC). En conjunto,

el calcio, por interacción con proteínas quinasas dependientes de calcio como la calmodulina, y la PKC, fosforilan distintos sustratos que intervienen en la remodelación del citoesqueleto de actina y la exocitosis apical (Williams, 2001). La acetilcolina estimula la exocitosis por interacción con receptores muscarínicos M1 y M3, que también activan la vía PLC/PKC. Los receptores M1 son importantes mediadores de la fracción enzimática de la secreción pancreática basal (Niebergall-Roth y Singer, 2001 y 2003).

La secretina se une a su receptor específico, pero puede asimismo unirse con baja afinidad al receptor de VIP (VPAC1) que pertenece a la familia de receptores VIP-PACAP. El VIP a su vez se une a VPAC1 y VPAC2 con alta y baja afinidad, respectivamente (Ulrich y col., 1998). Estos receptores activan la enzima adenilato ciclasa incrementando los niveles intracelulares de AMPc, con la consiguiente estimulación de la proteína quinasa A (PKA) que fosforila distintos sustratos que participan en la secreción enzimática (Ulrich y col., 1998). La secretina constituye el principal estímulo para la secreción de agua y bicarbonato por parte de las células ductales. La hormona induce la despolarización de la membrana basolateral de la célula desencadenando un cambio en la conductancia de los receptores CFTR que promueven el aumento de la secreción de bicarbonato y, como consecuencia, de agua (Gray y col., 1988).

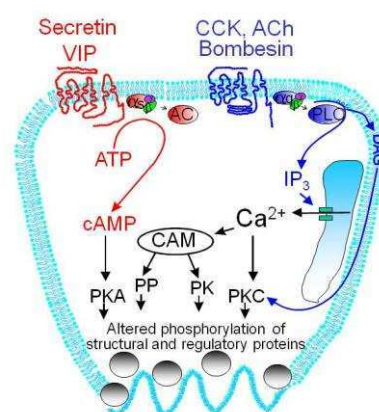


Figura 7: Secretagogos pancreáticos. La figura muestra las principales hormonas y péptidos que estimulan la exocitosis apical en la célula acinar y sus vías de señalización. Adaptado de www.pancreapedia.org/pathways “Acinar cell digestive enzyme secretion” (Williams y col., 2012).

La exocitosis se produce por fusión de la membrana de los gránulos de zimógeno con la membrana plasmática apical mediada por el calcio y las proteínas SNARE (del inglés *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptors*). Proteínas v-SNARE presentes en la membrana de las vesículas interactúan con proteínas t-SNARE, presentes en la membrana apical, con la participación de factores solubles. El mecanismo es regulado por proteínas Rab, pertenecientes a la familia de proteínas G pequeñas (Williams, 2008).

1.5- Regulación de la secreción pancreática durante la ingesta

La secreción pancreática se divide en tres etapas: la etapa cefálica, la etapa gástrica y la etapa intestinal. Estas etapas están reguladas por el sistema nervioso, hormonas, péptidos, así como también por nutrientes presentes en el quimo ácido que llega al lumen intestinal (Chandra y Liddle, 2015, Pandol y col., 2015).

Estímulos sensoriales mediados por el olfato, gusto y vista anticipan la ingesta e inician la etapa cefálica. Entre un 20 y un 25% de la secreción pancreática ocurre durante esta fase que se caracteriza por la secreción de enzimas digestivas y, en menor medida, por la secreción de bicarbonato, reflejando una mayor actividad de las células acinares frente a las ductales. En esta etapa participan estímulos sensoriales que ingresan al sistema nervioso central a través del complejo dorsal del vago y se transmiten luego al páncreas exocrino a través del nervio vago. La mediación de la respuesta secretora por aferencias vagales en la fase cefálica está representada principalmente por el VIP y el GRP liberados al efluente venoso pancreático (Holst y col, 1984).

La etapa gástrica, regulada asimismo por el nervio vago, se inicia con el ingreso de los alimentos al estómago. Durante esta fase se libera aproximadamente el 10% de la secreción pancreática que consiste principalmente en enzimas digestivas liberadas por las células acinares.

El medio ácido que acompaña al alimento proveniente del estómago inicia la estimulación pancreática durante la etapa intestinal. Esta etapa representa hasta el 80% de la secreción

pancreática. La etapa intestinal posee una regulación compleja que incluye mecanismos nerviosos, peptidérgicos y hormonales. El quimo ácido es un fuerte inductor de la secreción de bicarbonato y de la liberación de secretina por las células S del intestino. Los ácidos grasos y péptidos fragmentados presentes en el lumen intestinal estimulan la liberación de CCK de las células I intestinales. Además de las hormonas, esta fase está regulada por reflejos entero-pancreáticos vago-vagales.

Trabajos realizados en nuestro laboratorio muestran que los péptidos natriuréticos participan activamente en la regulación de la funcionalidad del páncreas exocrino como se detalla en el siguiente capítulo (*Sabbatini y col., 2003; 2007a; 2007b; Rodríguez y col., 2011; Ventimiglia y col., 2015*).

La funcionalidad del páncreas exocrino exhibe una compleja regulación mediada por mecanismos nerviosos, hormonales y peptidérgicos que activan vías de señalización mediadas por el AMPc y el calcio. En los últimos años distintos péptidos han cobrado importancia en la regulación del páncreas a través de la activación y/o modulación de estas vías de señalización. Entre estos péptidos se encuentra el factor natriurético atrial (ANF), actor fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular y renal, pero con notable participación en la regulación de la función digestiva, y en particular del páncreas exocrino en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas independientemente de sus propiedades vasoactivas.

2- EL FACTOR NATRIURÉTICO ATRIAL

En 1981 de Bold y colaboradores observaron que la administración de extractos atriales en ratas provocaba una rápida y potente diuresis y natriuresis, lo que indicaba la presencia de una sustancia con acción renal en la preparación (*de Bold y col., 1981*). Estudios posteriores llevaron al aislamiento y secuenciación de un péptido que se denominó factor natriurético atrial (ANF), el

primer miembro de una familia de péptidos con potente actividad natriurética, diurética y vasodilatadora (Flynn y col., 1983; Kangawa y Matsuo, 1984). El descubrimiento realizado por el laboratorio del Dr. de Bold marcó un hito en la fisiología cardiovascular ya que el corazón dejó de considerarse una simple bomba mecánica impulsora de sangre para pasar a convertirse asimismo en un órgano endocrino.

Con posterioridad se describieron otros miembros de la familia con funciones biológicas y estructura química similar al ANF: el Péptido Natriurético tipo B (BNP, *B-type natriuretic peptide*) y el Péptido Natriurético tipo C (CNP: *C-type Natriuretic Peptide*). El BNP se denominó B por “*brain*” ya que fue inicialmente encontrado en cerebro, si bien estudios posteriores confirmaron que es sintetizado mayoritariamente por cardiomiocitos ventriculares y exhibe propiedades similares al ANF (Kuhn, 2004). El CNP se expresa principalmente en el endotelio vascular y en el sistema nervioso central y regula la función cardiovascular de forma paracrina si bien carece del efecto diurético/ natriurético exhibidos por los otros miembros de la familia (Ohyama y col., 1992; Woodard y col., 2002).

2.1- Estructura, síntesis, liberación y degradación del ANF

Si bien los péptidos natriuréticos muestran características estructurales y bioquímicas muy similares, son codificados por genes distintos. Asimismo, se sintetizan de manera diferencial en los distintos tejidos y se unen a receptores específicos de membrana (Brenner y col., 1990; Koller y col., 1992; Venugopal, 2001).

El gen que codifica el ANF presenta tres exones interrumpidos por dos intrones y en el humano se ubica en el brazo largo del cromosoma 1 (p 36.2). El péptido se sintetiza primordialmente en los cardiomiocitos atriales y se almacena en gránulos intracelulares (de Bold, 1985). La secuencia aminoacídica del ANF se encuentra ampliamente conservada entre los mamíferos. En su forma activa, el ANF es un péptido de 28 aminoácidos que cuenta con un anillo

de 17 residuos, unido por un puente disulfuro, esencial para su actividad biológica (*Figura 8*). El ANF se sintetiza como un pre-pro-péptido de 151 aminoácidos que, por clivaje proteolítico de la región amino terminal, genera un pro-péptido de 126 aminoácidos, que es la forma preponderante de almacenamiento en los gránulos del atrio cardíaco (*Potter y col., 2006*). Antes de su liberación, la pro-hormona es clivada en la región amino terminal por la enzima corina, presente en la membrana de los cardiomiocitos, generando el péptido biológicamente activo de 28 aminoácidos, forma circulante en sangre (*Pandey, 2005*).

Tejido Procesamiento proteolítico Proteína madura

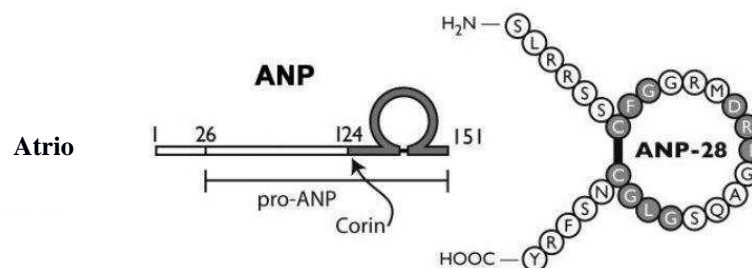


Figura 8: Expresión tisular, procesamiento y estructura del ANF. El ANF se sintetiza en el atrio como un pre-pro-péptido de 151 aminoácidos, que por clivaje proteolítico origina un pro-peptido de 126 aminoácidos que se almacena en gránulos. El péptido biológicamente activo consta de 28 aminoácidos generado por acción de la enzima corina presente en los gránulos. ANP: Factor natriurético atrial. Adaptado de *Potter y col., 2006*).

El ANF se sintetiza y secreta en forma constitutiva en los cardiomiocitos atriales, si bien en situaciones fisiopatológicas los cardiomiocitos ventriculares también lo producen (*de Bold y col., 1996*). La síntesis y liberación de ANF son estimuladas principalmente por estrés mecánico de la pared cardíaca provocado por estiramiento en condiciones de aumento del retorno venoso (*Edwards y col., 1988; Pandey, 2005*). Asimismo, otros factores como la angiotensina II, endotelina 1 y agonistas α -adrenérgicos también estimulan la liberación de ANF (*Bruneau y de Bold, 1994; de Bold y col., 1996*). Luego de ser secretado, el ANF ingresa a la circulación a través

del seno coronario para ejercer funciones diuréticas, natriuréticas y vasoactivas, entre otras.

Si bien el atrio cardíaco es la principal fuente de producción de ANF, el péptido es asimismo sintetizado en otros tejidos. La presencia de ANF y su ARNm se han descrito en pulmón, el arco aórtico, riñón y glándula adrenal (*McKenzie y col., 1985; Gardner y col., 1986 y 1987; Ong y col., 1987; Morel y col., 1988*). En el sistema nervioso central el péptido se sintetiza en la hipófisis, el bulbo olfatorio, el tronco cerebral y en distintas regiones del sistema límbico (*Langub y col., 1995*). En el sistema gastrointestinal, se ha demostrado la síntesis de ANF en las células de la mucosa gástrica, colon y recto, así como en las glándulas salivales (*Gower y col., 1994; Janowski y col., 1996*). Los estímulos que provocan su liberación de fuentes extra-cardíacas no se encuentran esclarecidos, pero se asume que la distensión intestinal, similar a la distensión auricular, sería el estímulo que induciría su liberación del tracto gastrointestinal. A nivel gástrico se demostró que el ANF es liberado a través de estímulos nerviosos y peptidérgicos (*Gower y col., 2003*).

ANF se metaboliza a través de dos mecanismos: la internalización mediada por el receptor NPR-C y la escisión proteolítica por la endopeptidasa neutra (NEP) 24.11. El receptor NPR-C se expresa en varios tejidos, incluyendo riñones, glándulas suprarrenales, pulmones, endotelio vascular, corazón, intestino y cerebro (*Cerra, 1994; Fuller y col., 1988*) y representa hasta el 95% de toda la expresión de los receptores de péptidos natriuréticos. Esta amplia y estratégica distribución también sustenta su participación en el metabolismo de péptidos natriuréticos. La potencia de unión a NPR-C en los seres humanos es ANF > CNP ≥ BNP (*Suga y col., 1992*), con un orden de magnitud entre ANF y BNP. El NPR-C reconoce un fragmento lineal de ocho aminoácidos de la molécula de ANF. Este requisito estructural es mucho menos riguroso que el anillo de 17-aminoácidos formado por el puente disulfuro necesario para unión al receptor NPR-A. La internalización de NPR-C se produce a una tasa de 5% -7% / min (*Cohen y col., 1996*). Este fenómeno no es estimulado por la unión al ligando haciendo de este un proceso constitutivo.

Dado que la internalización del receptor se produce mucho más rápido que la disociación de ANF de su receptor, el transporte y degradación del ligando puede lograrse de manera eficiente. Tras la internalización de ANF unido a NPR-C, el péptido es hidrolizado por los lisosomas y NPR-C se recicla a la superficie de la célula. La vida media de ANF es aproximadamente de 3 a 5 minutos, dependiendo de las especies, mientras que BNP posee una vida media significativamente más larga de 22,6 minutos. Esta divergencia se puede explicar por la reducción de la afinidad de unión de BNP a NPR-C, así como su menor tasa de hidrólisis por la NEP 24,11 (Holmes y col., 1993).

La NEP 24,11 inactiva a ANF mediante la escisión de sus restos hidrofílicos (Erdos y Skidgel, 1989). Esta metaloproteasa de zinc se encuentra principalmente en los túbulos proximales renales del riñón así como en todo el endotelio vascular pulmonar y el corazón. NEP 24,11 es no saturable y se colocaliza con la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (Skidgel y col., 1984). La NEP 24,11 contribuye significativamente a la eliminación de ANF en aquellas situaciones donde NPR-C está saturado (Hashimoto y col., 1994). La afinidad de unión de NEP 24,11 a péptidos natriuréticos es: CNP > ANF > BNP (Suga y col., 1992).

2.2- Receptores de los péptidos natriuréticos

Los péptidos natriuréticos ejercen sus acciones biológicas a través de la unión a tres tipos de receptores específicos de membrana: el NPR-A (del inglés: *natriuretic peptide receptor-A*), el NPR-B (del inglés: *natriuretic peptide receptor-B*) y el NPR-C (del inglés: *natriuretic peptide receptor-C*). El NPR-A presenta mayor afinidad por el ANF y en menor medida por el BNP, el NPR-B tiene mayor afinidad por el CNP mientras que el NPR-C muestra igual afinidad por los tres péptidos (Potter y col., 2006). Estos receptores no pertenecen a la familia de los GPCRs.

El NPR-A y el NPR-B son receptores con actividad guanilatoclasa (GC). Presentan un dominio extracelular de unión al sustrato y dos dominios intracelulares: un dominio con actividad tirosina quinasa (con función aún no esclarecida) y un dominio catalítico GC (Figura 9) (Potter,

2011). En su estado basal, el dominio con actividad GC se encuentra como homodímero o bien homotetrámero en un estado altamente fosforilado (*Pandey y Singhn, 1990; Tremblay y col., 1991; Lowe y Fendly, 1992; Garbers, 1999*). La desfosforilación finaliza la señal de activación, a diferencia de los receptores acoplados a proteína G que son desensibilizados por fosforilación (*Potter y Hunter, 1998; Tremblay y col., 2002*). La unión al ligando induce la activación del dominio GC causando un rápido aumento de GMPc a partir de guanosina trifosfato que lleva a la activación río bajo de efectores como la proteína quinasa dependiente de GMPc tipo I (PKG I) y tipo II (PKG II), canales iónicos regulados por GMPc, fosfatasa y fosfodiesterasas (PDEs) (PDE2, PDE3) sensibles a GMPc que median la respuesta biológica (*Maack, 1992; Lincoln y Cornwell, 1993; Fowkes y McArdle, 2000*). El GMPc es el segundo mensajero que media la mayoría de los efectos biológicos de los péptidos natriuréticos reportados a nivel renal y cardiovascular.

El receptor NPR-C es un homodímero con un único dominio transmembrana, un dominio extracelular de aproximadamente 496 aminoácidos y una corta cola intracelular de 37 aminoácidos y no presenta homología con ningún receptor descrito al presente (*Fuller y col, 1988; Anand-Srivastava, 2005; Woodard y col., 2005*). Este subtipo de receptor está desprovisto de dominios GC y tirosina quinasa y debido a su pequeño dominio intracelular, su amplia distribución en el organismo y su capacidad de internalizar ligandos para su degradación se pensó inicialmente que se trataba de un receptor biológicamente silencioso cuya función era regular los niveles circulantes de los péptidos natriuréticos (*Maack y col, 1987*).

Sin embargo, distintos estudios funcionales mostraban la existencia de efectos mediados por el ANF que sugerían la existencia de otro/s receptore/s acoplado/s a una señalización intracelular distinta del GMPc (*Fernández y col., 1993; Bianciotti y col., 1994; 1996; 1998; Anand-Srivastava, 2005*). En efecto, estudios posteriores mostraron que el dominio intracelular de NPR-C tiene diversos sitios de activación de Gi y que su estimulación induce inhibición de la enzima adenilato ciclasa y/o activación de PLC (*Anand-Srivastava y col., 1996; Murthy y*

Makhlouf, 1999; Murthy y col., 2000; Pagano y Anand- Srivastava, 2001; Anand- Srivastava, 2005).

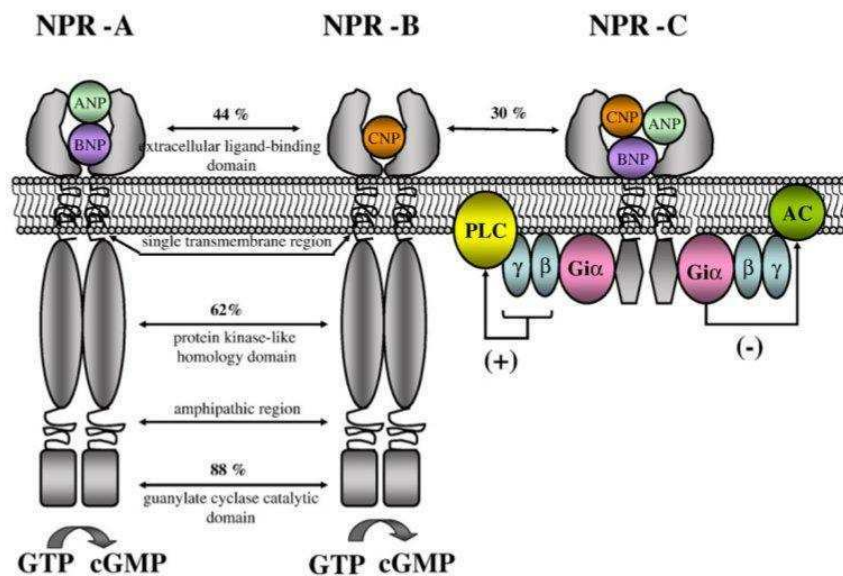


Figura 9. Receptores de los péptidos natriuréticos. Los receptores NPR-A y NPR-B presentan un dominio de unión a ligando, un dominio homólogo a proteína quinasa y un dominio guanilato ciclasa. Su activación lleva al incremento intracelular de GMPc. El receptor NPR-C une los tres péptidos natriuréticos con igual afinidad y posee un pequeño dominio intracelular de 37 aminoácidos que presenta sitios de activación de Gi. Su activación inhibe adenilato ciclasa y estimula fosfolipasa C a través de las subunidades $\beta\gamma$ (Sabbatini, 2009).

La subunidad de Gi inhibe adenilato ciclasa disminuyendo los niveles de AMPc, mientras que las subunidades $\beta\gamma$ activan PLC β generando IP₃, que incrementa el calcio intracelular y el DAG que promueve fosforilación de diversos sustratos (Savoie y col., 1995; Rose y Giles, 2008; Rubattu y col., 2010) (Figura 9). Sin embargo, NPR-C no es un GPCR tradicional ya que no presenta siete dominios transmembrana como los GPCRs descriptos.

NPR-C es un homodímero con dos subunidades de 67 y 77 kDa (Savoie y col., 1995; Anand- Srivastava, 2005; Rose y Giles, 2008; Rubattu y col., 2010) en donde la primera se acopla a la inhibición de adenilato ciclasa mientras que la segunda está implicada en la internalización del ligando como un receptor de *clearance* (Savoie y col., 1995; Murthy y col., 2000; Mouawad y Anand Srivastava, 2004). El subtipo de receptor de señalización a través de Gi es el predominante en células viscerales y vasculares del músculo liso (Gower y col., 1994).

Al presente no se han descritos antagonistas selectivos de los receptores de los péptidos natriuréticos. Existe una sola herramienta farmacológica disponible, el des [Gln18, Ser19, Gly20, Leu21, Gly22] ANP 4-23-amida (-cANP4-23), que es un péptido truncado que se une selectivamente a NPR-C y no muestra afinidad para NPR-A o NPR-B (*Maack y col., 1987*). Este péptido ha ayudado a revelar funciones biológicas acopladas a la activación de NPR-C y su regulación.

La evidencia experimental sustenta que el receptor NPR-C media la mayoría de los efectos de los péptidos natriuréticos reportados a nivel del sistema digestivo (*Anand-Srivastava y Trachte, 1993; Brenner y col., 1990; Sabbatini y col., 2003; 2007a; 2007b*).

2.3- Funciones biológicas del ANF

El ANF liberado de los cardiomiocitos atriales regula la homeostasis cardiovascular mediante acciones diuréticas, natriuréticas e hipotensoras. La regulación de la fisiología cardiovascular está mediada en forma específica por el receptor NPR-A a través del incremento de GMPC. Este receptor se localiza en diversos tejidos, como el riñón, vasos sanguíneos y la glándula adrenal (*Kuhn, 2004*). Los mecanismos de acción del péptido incluyen la disminución del gasto cardíaco, la reducción de la resistencia vascular periférica y la disminución del volumen intravascular, entre otros (*Brenner y col., 1990*).

En el sistema reproductor, se demostró que el ANF estimula la síntesis y secreción de testosterona en las células de Leydig, progesterona en las células de la granulosa y de la hormona leutinizante en la hipófisis anterior (*Pandey y col., 1986 y 1987; Horvath y col., 1986; Mukhopadhyay y col., 1986*). Asimismo, se demostró que el ANF es capaz de estimular la embriogénesis y diferenciación celular, así como también la actividad osteoclástica (*Holliday y col., 1995; Suda y col., 1996*). En muchos de estos tejidos se ha demostrado también la síntesis y expresión del ANF, lo que sugiere que el péptido tendría una función autocrina y/o parácrina

(Pandey, 2005).

Distintos estudios muestran que el ANF participa en la regulación de la respuesta inmune innata como adaptativa. En la respuesta inmune innata distintos trabajos muestran que el péptido actuaría como factor anti-inflamatorio (De Vito, 2014). En cultivos de macrófagos se demostró que el ANF inhibe la expresión del factor de transcripción NF- κ B y de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α (Tsukagoshi y col., 2001), reduce a través del receptor NPR-C la síntesis y expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), (Kierner y col., 2002) e inhibe la liberación de óxido nítrico (NO) por inhibición de la expresión de la enzima óxido nítrico inducible (iNOS) (Kierner y Vollmar, 2001). En modelos *in vivo* de injuria aguda de pulmón, el tratamiento con ANF mejora el perfil histopatológico acompañado de la reducción de marcadores pro-inflamatorios como la interleuquina (IL)-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Zhu y col., 2013). Se ha demostrado también que las células dendríticas poseen receptores para ANF (Morita y col., 2003) y que estas células estimuladas por lipopolisacáridos en presencia de ANF disminuyen la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-12 y TNF- α e incrementan los niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, reflejando el papel del péptido en la respuesta inmune adaptativa (Zhang y col., 2001).

El ANF regula asimismo la fisiología del sistema digestivo. En nuestro laboratorio se demostró que el ANF estimula la secreción salival, incrementa la liberación de la amilasa y modifica la composición de los electrolitos salivales a través del receptor NPR-C (Bianciotti y col., 1994 y 1996; Ventimiglia y col., 2008). Los receptores natriuréticos también fueron descritos en el hígado humano (Vollmar y col., 1997). En nuestro laboratorio se demostró que el ANF tanto a nivel periférico como central regula la secreción biliar y modifica su composición en la rata (Fernández y col., 1993; Bianciotti y col., 2001). Asimismo, otros autores demostraron que el ANF incrementa la secreción gástrica (Puurunen y Ruskoaho, 1987) y disminuye la absorción intestinal de agua y sodio (Martinez Seeber y col., 1986). La expresión del péptido en las glándulas salivales,

colon, estómago e intestino indican que el ANF ejerce una regulación autocrina y/o paracrina en el sistema gastrointestinal (*Cantin y col., 1984; Vollmar y col., 1991; Gower y col., 1994; Janowski y col., 1996*).

2.4- ANF y el páncreas exocrino

Luego del descubrimiento del ANF, distintos estudios mostraron la presencia de ANF inmunorreactivo en el páncreas exocrino de rata (*Chabot y col., 1987 y 1988; Adeghate y col., 1996*). Asimismo, se demostró que en las células acinares pancreáticas se produce un rápido aumento de los niveles intracelulares de GMPc en respuesta a ANF, sugiriendo que los receptores de los péptidos natriuréticos acoplados a la formación de GMPc (NPR-A y/o NPR-B) se expresan en el páncreas exocrino (*Heisler y col., 1987*). Estudios posteriores realizados en nuestro laboratorio mostraron que los tres receptores de los péptidos natriuréticos se expresan en el páncreas exocrino de rata (*Sabbatini y col., 2007*). El ANF regula la función del páncreas exocrino, actúa como secretagogo a través del receptor NPR- C estimulando la secreción de la fracción tanto acuosa como enzimática del jugo pancreática y potencia la acción de las hormonas secretina y CCK (*Sabbatini y col., 2003*). Si bien potencia la secreción pancreática estimulada por secretina, al aumentar la concentración de la hormona, el ANF disminuye su respuesta. El péptido desensibiliza la respuesta de secretina, al inhibir el aumento de AMPc inducido por la hormona (*Sabbatini y col., 2007*). Estudios diseñados a fin de evaluar el mecanismo subyacente mostraron que el ANF, a través del receptor NPR-C acoplado a la activación de la vía PLC/PKC, favorece la salida de AMPc de las células acinares pancreáticas. Este fenómeno mediado por ANF se observa asimismo en presencia de VIP cuya respuesta secretora es de magnitud similar a secretina y también mediada por AMPc (*Sabbatini y col., 2007*). El eflujo de AMPc en el páncreas es probenecid sensible, lo que implica que está mediado por proteínas de resistencia a multidroga (MRPs), en particular MRP4, lo que confirmamos en células AR42J con silenciamiento de MRP4 al observar que la salida de

AMPC se inhibía significativamente (Rodríguez y col., 2013). Estos estudios muestran que ANF constituye un mecanismo adicional a las PDEs en la regulación de los niveles intracelulares de AMPC en el páncreas.

Los hallazgos reportados por estudios de nuestro laboratorio y de otros autores muestran que el ANF regula la funcionalidad del páncreas exocrino estimulando la secreción pancreática y regulando negativamente los niveles intracelulares de AMPC a través del receptor NPR-C acoplado a la activación de la vía PLC/PKC. Las observaciones de que una elevación importante de AMPC predispone al desarrollo de pancreatitis aguda, sugerían que el ANF podría tener un papel protector en los eventos tempranos que disparan la patología frente a un aumento de este segundo mensajero. De hecho, los estudios in vivo que se detallarán en el próximo apartado comprueban en parte esta hipótesis en un modelo animal de la patología. La pancreatitis aguda es una entidad nosológica prevalente cuyos mecanismos fisiopatológicos tempranos no se hallan totalmente esclarecidos ni tampoco los eventos que condicionan su evolución a formas graves de la patología.

3- LA PANCREATITIS AGUDA

Una de las patologías más frecuentes que afecta al páncreas exocrino es la pancreatitis aguda. Es una entidad nosológica prevalente que se define como la inflamación súbita del páncreas producida por la activación temprana de las enzimas digestivas dentro de la célula acinar, lo que lleva a la autodigestión de la glándula mediada por las mismas enzimas que sintetiza. Clínicamente se caracteriza por dolor abdominal intenso (abdomen agudo) acompañado de elevados niveles plasmáticos de amilasa y lipasa pancreáticas. El proceso se inicia como un daño local que desencadena una intensa respuesta inflamatoria *in situ* la que puede eventualmente propagarse

hacia otros órganos, produciendo shock séptico y falla multiorgánica. De esta forma, la pancreatitis aguda puede manifestarse desde una forma benigna y autolimitada hasta una forma grave con elevada mortalidad. En la actualidad, los eventos tempranos que desencadenan la pancreatitis aguda permanecen aún sin esclarecerse completamente al igual que los factores que condicionan su evolución a formas más severas, lo que hace necesario un mayor conocimiento de su patogénesis a los fines de diseñar y desarrollar nuevas alternativas terapéuticas y/o marcadores pronósticos de la enfermedad (*Frossard y col., 2008; Tonsi y col., 2009; Sah y col., 2013*).

3.1- Etiología y epidemiología

La pancreatitis aguda es la principal patología gastrointestinal diagnosticada en guardias hospitalarias siendo su incidencia del 30% (*Peery y col., 2012*). En el 80% de los casos se evidencia como una forma leve a moderada resolviéndose sin presentar mayores complicaciones mientras que el 20% de los pacientes desarrolla pancreatitis aguda severa (necrotizante), con complicaciones locales y sistémicas, que entraña una mortalidad del 10 al 24% (*Mao y Qiu, 2012*).

Se reconocen distintos factores desencadenantes de la patología, si bien se desconocen en detalle los mecanismos subyacentes. El 75%-85% de los casos obedece principalmente a litiasis biliar y alcoholismo, y en menor proporción a traumas y factores hereditarios (*Cruz-Santamaría y col., 2012*). El 15-25% de los casos restantes obedece a causas de origen ideopático (*Frossard y col., 2008*). La pancreatitis aguda de origen biliar representa el 38% de los casos en los países desarrollados (*Frossard y col., 2008*). Se produce como resultado de la obstrucción provocada por cálculos biliares en el colédoco, el conducto pancreático, o ambos lo que genera hipertensión pancreática ductal, llevando a una desregulación de la actividad enzimática en la glándula y desencadenando así la patología (*Figura 10*). Este tipo de pancreatitis puede asimismo generarse luego de una colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE), por disfunción del esfínter

de Oddi, por colesterosis o por tumores en la ampolla de Vater. La CPRE es una técnica especializada que se usa para estudiar los conductos de la vesícula, el páncreas y el hígado.

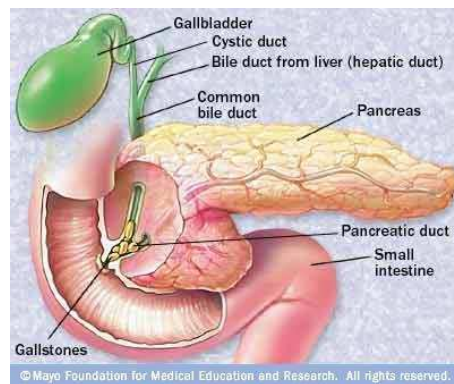


Figura 10: Pancreatitis aguda por litiasis biliar. La litiasis biliar puede provocar colédocolitis que eventualmente lleva a pancreatitis aguda. La figura muestra la obstrucción del colédoco y el conducto de Wirsung por cálculos originados en la vesícula biliar (Ilhan y Alis, 2011).

El consumo crónico y abusivo de alcohol es responsable del 36% de los casos de pancreatitis aguda en los países desarrollados (Frossard y col., 2008). Si bien la incidencia es proporcional al nivel de consumo de alcohol, sólo el 5% de los consumidores abusivos desarrolla pancreatitis aguda (Steinberg y Tenner, 1994). Por lo tanto, se considera que el alcoholismo crónico genera cambios metabólicos que sensibilizan el páncreas, pero que se requiere un factor adicional para desarrollar la patología. Entre los cambios metabólicos, se cree que el consumo de alcohol crónico predispone la activación prematura de las enzimas digestivas dentro de la célula acinar (Apte y col., 1998).

Si bien no existen diferencias entre sexos en la incidencia de la patología, la pancreatitis aguda por litiasis biliar es más frecuente en mujeres mientras que la causada por alcoholismo se presenta principalmente en hombres (Dufour y col., 2002).

La pancreatitis aguda hereditaria es poco frecuente, presentándose sólo en el 1% de los casos (Joergensen y col., 2010). Se han reportado mutaciones en el gen del tripsinógeno catiónico que predisponen a padecer pancreatitis aguda recurrente. También se han descrito mutaciones en

los genes que codifican el transportador ductal CFTR y la enzima inhibidora del tripsinógeno SPIK1. Variantes en estos genes predisponen a la activación dentro de la célula acinar del tripsinógeno y son responsables del desarrollo de la patología en forma recurrente (*Whitcomb y col., 2010*).

3.2- Fisiopatología

Los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan la pancreatitis aguda aún no se conocen con exactitud. Estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*, así como la evidencia en pacientes con alteraciones genéticas indican que los eventos patológicos se inician en la célula acinar (*Gorelick y Thrower, 2009*).

La célula acinar secreta una tasa de hasta diez millones de enzimas por día, pero posee mecanismos de protección que evitan que estas enzimas se activen prematuramente dentro de la célula y provoquen autodigestión de la glándula como se describió previamente. La alteración de estos mecanismos promueve la activación *in situ* de las enzimas provocando daño y muerte celular. El principal factor desencadenante en las primeras etapas es la activación prematura del tripsinógeno a tripsina por acción de la enzima lisosomal catepsina B, lo que se encuadra dentro de la teoría de la co-localización que establece que las enzimas contenidas en los gránulos de zimógeno se co-localizarían en organelas con enzimas lisosomales produciéndose así la activación *in situ* de las enzimas digestivas (*van Acker y col., 2006*). La activación del tripsinógeno promueve además de su autoactivación, la activación en cascada del resto de las enzimas provocando muerte celular por necrosis y apoptosis. Se considera que la activación del tripsinógeno sería el mecanismo disparador si bien se cuestiona que no es suficiente para promover la propagación sistémica de la patología (*Sah y col., 2013*).

Los agentes etiológicos promueven la activación del factor de transcripción NF- κ B responsable de disparar y propagar una importante respuesta inflamatoria local a través de la

estimulación de distintos factores pro-inflamatorios. Durante años se pensó que la activación del tripsinógeno era responsable de la activación de NF- κ B, si bien estudios recientes muestran que se trata de mecanismos independientes que por sí solos son capaces de provocar pancreatitis aguda (Sah y col., 2013). La activación de NF- κ B promueve una robusta respuesta inflamatoria en la que participan distintos mediadores inflamatorios de manera coordinada que amplifican la respuesta.

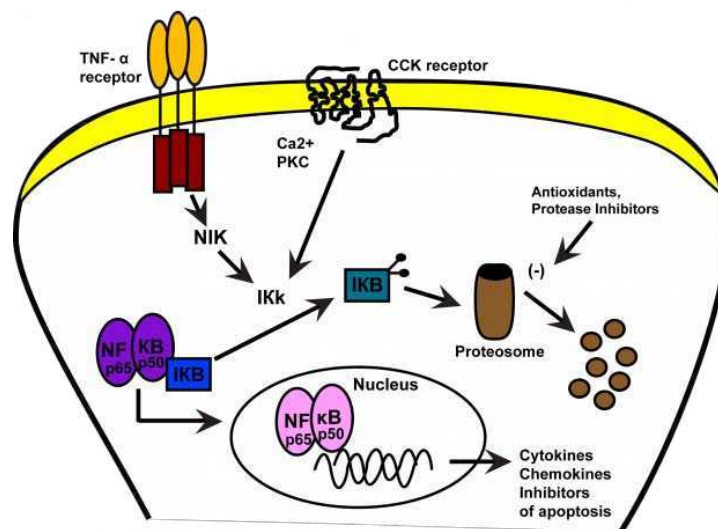


Figura 11: Regulación de la activación de NF- κ B en la célula acinar durante la pancreatitis aguda. Las proteínas inhibidoras I κ B secuestran a NF- κ B en el citoplasma evitando su translocación a núcleo. La hiperestimulación de la célula por citoquinas o ceruleína (análogo de la CCK) promueve la fosforilación de I κ B por parte de la proteína IKK y su posterior degradación por el proteosoma 26S. Una vez liberado NF- κ B transloca a núcleo donde se une al ADN y promueve la activación de citoquinas, quemoquinas y factores inhibidores de la apoptosis. Adaptado de www.pancreapedia.org/pathways "Regulation of NF- κ B activation" (Williams y col., 2012).

El NF- κ B es un factor de transcripción ubicuo responsable de mediar la activación de una amplia gama de genes, en particular aquellos involucrados en procesos inflamatorios, como citoquinas y quimoquinas. Es un heterodímero formado por proteínas miembro de la familia Rel: p50; p52; p65 (RelA); RelB y c-Rel. El complejo más frecuente es el dímero p50/p65. En condiciones normales, NF- κ B se encuentra inactivo y secuestrado en citoplasma por los inhibidores de la familia I κ B, siendo los más importantes I κ B- α e I κ B- β (Sen y Baltimore, 1986;

Baldwin, 1996). Factores como citoquinas y especies reactivas del oxígeno inducen por acción de una quinasa (I κ B) la fosforilación de I κ B y su posterior degradación por el proteosoma 26S (*Barnes y col., 1997*) lo que favorece la liberación y translocación de NF- κ B al núcleo para estimular la transcripción de mediadores inflamatorios como el TNF- α .

Asimismo, la activación de NF- κ B promueve la síntesis y liberación de otras citoquinas pro-inflamatorias y metabolitos del ácido araquidónico que propagan y retroalimentan la respuesta inflamatoria favoreciendo el daño a nivel sistémico (*Figura 11*) (*Uhl y col., 1998; Kingsnorth y O'Reilly, 2006*).

El TNF- α es una citoquina pleiotrófica involucrada en procesos autoinmunes e inflamatorios; regula la expresión de otras citoquinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión leucocitaria y es, por lo tanto, un factor clave en la activación de las células del sistema inmune. En los últimos años distintos estudios sugieren que el TNF- α juega un papel central en la patogénesis de la pancreatitis aguda, en particular en la progresión de la respuesta inflamatoria sistémica (*Malleo y col., 2007*).

El daño de las células acinares promueve la infiltración de neutrófilos al páncreas y la liberación de distintos mediadores inflamatorios. En los estadios tempranos de la pancreatitis aguda la activación *in situ* del tripsinógeno a tripsina promueve la liberación de moléculas de adhesión y moléculas pro-inflamatorias (P-selectina, TNF- α , e interleuquina 6 [IL-6]) por parte de la célula acinar. Estas moléculas son capaces de estimular la infiltración neutrofílica en el páncreas. Los neutrófilos activados liberan altas concentraciones de agentes oxidantes y citotóxicos que amplifican el daño focal hacia todo el tejido pancreático (*Hartwig y col., 1999*). Si la inflamación continúa, una segunda oleada de neutrófilos infiltra el páncreas, siendo capaces de propagar y agravar el daño hacia otros tejidos generando una respuesta inflamatoria multisistémica que eventualmente lleva a falla multiorgánica. Evidencias recientes sostienen que la activación del tripsinógeno induce el infiltrado de neutrófilos y que, una vez en el páncreas, los neutrófilos

promueven una segunda activación de tripsinógeno, sosteniendo y propagando la patología (Yang y col., 2015).

Las MAP quinasas (del inglés: *mitogen-activated protein kinases*) (MAPKs) participan asimismo del desarrollo de la pancreatitis aguda. Son treoninas quinasas que convierten estímulos extracelulares en un amplio rango de respuestas celulares. Las MAPKs forman parte de las vías de señalización intracelulares que incluyen la regulación de la expresión génica, mitosis, metabolismo, sobrevivencia, apoptosis y diferenciación celular, entre otros. Existen tres familias principales de MAPKs: la vía de las ERK 1/2 (del inglés: *Signal-Regulated Kinases 1/2*), la vía de JNK 1/2/3 (del inglés: *c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3*) y la vía de p38 (Cargnello y Roux, 2011). ERK 1 y ERK 2 se activan por factores de crecimiento, insulina y ligandos asociados a GPCRs, así como también por citoquinas y factores pro-inflamatorios mediante la vía de proteínas G pequeñas Ras/Raf. No obstante, los estímulos pro-inflamatorios también pueden actuar en forma independiente de estas pequeñas proteínas. En condiciones fisiológicas, la activación de ERK 1/2 cumple un papel central en la proliferación celular, entre otros (Irrera y col., 2014). JNK y p38 responden principalmente a estímulos de estrés y pro-inflamatorios. El factor de transcripción c-Jun es uno de los principales sustratos descritos para JNK, que promueve la formación del complejo AP-1, quien estimula la transcripción de genes que regulan el ciclo celular y la muerte celular por apoptosis (Irrera y col., 2014). La vía de p38 puede ser activada a través de GPCRs y la familia de proteínas Rho y cumple un rol importante en la regulación de la respuesta inflamatoria al activar factores de transcripción como NF- κ B. La p38 también regula la proliferación celular y la sobrevivencia (Conze y col., 2002). Se ha propuesto que la activación de las MAPKs es un evento temprano en la pancreatitis aguda, cumplirían un papel importante en la progresión de la respuesta inflamatoria local hacia la sistémica. Se ha demostrado que ambas isoformas de ERK se activan tempranamente en acinos pancreáticos luego de la estimulación con CCK o ceruleína (análogo de CCK empleado para generar pancreatitis aguda experimental). En forma más lenta que ERK, JNK

también se activa tempranamente luego de la inducción de la patología (Irrera y col., 2014). Las MAPKs amplifican la respuesta inflamatoria en la pancreatitis aguda por estimulación de la transcripción de genes que codifican para citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 (Figura 12).

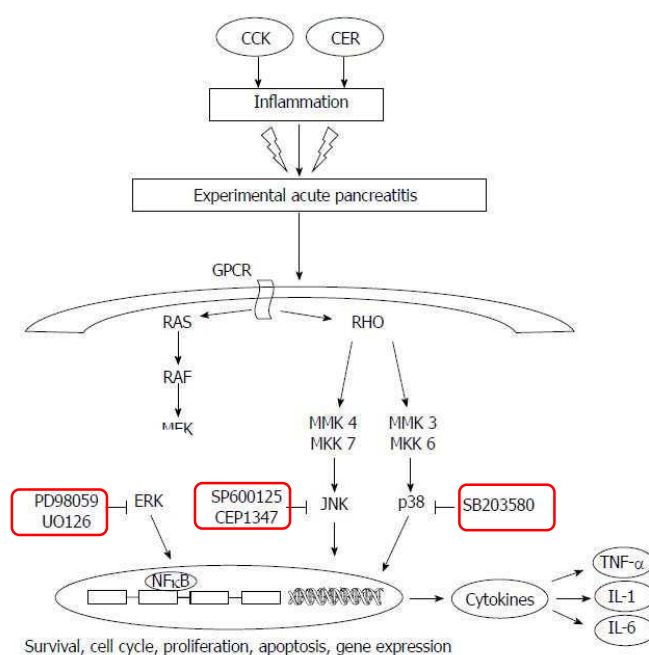


Figura 12: Esquema de activación de las MAPKs. Las MAPKs ERK, JNK y p38 son activadas en la pancreatitis aguda. ERK1 y ERK2 favorecen la activación de NF- κ B mientras que JNK y p38 activan directamente la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias. Enmarcados en rojo se señalan inhibidores comerciales de las distintas vías de las MAPKs (Irrera y col., 2014).

Durante la pancreatitis aguda también se produce la activación de enzimas inducibles como COX-2 e iNOS, que amplifican la respuesta inflamatoria estimulando la producción prostaglandinas (PGs) y NO, respectivamente.

Las ciclooxigenasas son las enzimas responsables de catalizar el paso limitante de la síntesis de PGs, leucotrienos y tromboxanos a partir del ácido araquidónico (Needleman y col., 1986). Se reconocen dos isoformas, la COX-1 y la COX-2. La COX-1 es de expresión constitutiva y regula procesos fisiológicos a través de la síntesis PGs, como la protección de la mucosa gástrica

o la regulación del flujo renal (*Smith y col., 1996*). La expresión de la COX-2, en cambio, es estimulada por mitógenos y agentes pro-inflamatorios como la IL-1 β y TNF- α (*Williams y DuBois, 1996; Guan y col., 1998; Diaz y col., 1998; Serou y col., 1999*). En la pancreatitis aguda la expresión de la COX-2 se evidencia en estadios tempranos y participa en la amplificación y propagación de la respuesta inflamatoria a través de la síntesis de PGs, en particular la prostaglandina E2 (PGE2) que estimula la permeabilidad vascular, la formación de edemas y la síntesis de mediadores inflamatorios (*Zhou y col., 1994; van Ooijen y col., 1998*). La sobre-expresión de COX-2 en modelos animales de pancreatitis aguda agrava la patología, aumentando la necrosis tisular y la infiltración leucocitaria mientras que su inhibición atenúa significativamente el proceso inflamatorio desencadenado en la pancreatitis. (*Song y col., 2002; Foitzik y col., 2003; Polito y col., 2010*).

Las oxido nítrico sintasas son enzimas que producen NO a partir de la L-arginina. Existen tres isoformas, la isoforme neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la iNOS (*Moncada y Higgs, 1993*). El NO presenta un comportamiento bifásico ya que bajas concentraciones producidas por la nNOS y la eNOS regulan múltiples funciones fisiológicas como la homeostasis endotelial, mientras que concentraciones elevadas producidas por la iNOS tiene efectos citotóxicos (*Kuo y Schroeder, 1995*). Durante la pancreatitis aguda las citoquinas pro-inflamatorias estimulan la expresión de la iNOS. Se han reportado efectos ambiguos del NO en el curso de la pancreatitis aguda (*Sugiyama y col., 2006*). Sin embargo, en modelos animales de la patología se observa que el aumento en la actividad de iNOS tiene efectos deletéreos y que su inhibición mejora el perfil de la patología (*Al-Mufti y col., 1998; Gukovsky y col., 2002*). En este sentido, ratones knockout para la iNOS atenúan el desarrollo de pancreatitis aguda inducido por ceruleína, indicando que su inhibición mejoraría el pronóstico de la enfermedad (*Cuzzocrea y col., 2002*).

En la pancreatitis aguda la respuesta inflamatoria y la activación in situ de las enzimas pancreáticas promueven la muerte de las células del páncreas exocrino. Distintos estudios clínicos

y experimentales muestran que la célula acinar puede morir por necrosis o por apoptosis y que el grado de severidad y mortalidad se correlaciona directamente con la extensión de la necrosis e inversamente con la respuesta apoptótica (*Kaiser y col., 1995; Gukovskaya y col., 1996; Saluja y col., 1996; Sandoval y col., 1996; Bhatia y col., 1998; Gukovskaya y Pandol, 2004*).

La necrosis se caracteriza por la pérdida progresiva de la integridad de la membrana plasmática, seguida por el ingreso de cationes, como sodio y potasio, seguido de agua, que resultan en el *swelling* celular (*Wyllie, 1994; Barros y col., 2001*). De esta forma, se produce la fragmentación celular y la liberación del contenido de la célula al espacio extracelular, desencadenando una respuesta inflamatoria local. Los agentes etiológicos que producen necrosis son en general exógenos como el estrés osmótico, ciertas toxinas, traumas o condiciones de hipoxia isquémica, aunque también se han descrito factores endógenos (*Buja y col., 1993; Majno y Joris, 1995*). Los mecanismos bioquímicos que desencadenan este proceso no han sido aun totalmente esclarecidos. En un principio, se creía que la necrosis era un proceso pasivo provocado por la depleción de ATP. Sin embargo, actualmente se sabe que también participan mecanismos activos, como el aumento intracelular de sodio o potasio y cambios en la permeabilidad mitocondrial (*Carini y col., 1995*).

La apoptosis, en cambio, es un mecanismo genéticamente controlado que se caracteriza por el *shrinkage* citoplasmático y nuclear, la marginación y fragmentación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos celulares, sin pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Este mecanismo de muerte celular se encuentra principalmente mediado por dos vías de señalización diferentes, aunque frecuentemente interconectadas: la vía extrínseca y la vía intrínseca, ambas mediadas por las caspasas, enzimas pertenecientes a la familia de las cisteín-proteasas (*Hengartner, 2000*).

Se han descrito al menos 12 caspasas en humanos, un tercio de las cuales intervendría en la apoptosis. Todas las caspasas poseen un sitio cisteína activo y reconocen y clivan sitios

específicos integrados por ácido aspártico seguido de cuatro residuos (Asp-XXXX). Las distintas subfamilias de caspasas se diferencian en la preferencia del sustrato (determinado por los cuatro residuos siguientes al ácido aspártico), identidad de secuencia y semejanzas estructurales. Estas proteínas se sintetizan como enzimas inactivas compuestas por 3 dominios: el prodominio N-terminal, el dominio p20 y el dominio p10. Los tres dominios se encuentran presentes en la enzima madura. La mayoría de las caspasas se activan por clivaje proteolítico entre los sitios p20 y p10 y/o entre los sitios N-terminal y p20 (*Thornberry y Lazebnik, 1998; Earnshaw y col., 1999*).

Las caspasas se pueden diferenciar en cuanto a su acción, distinguiéndolas entre caspasas iniciadoras y caspasas efectoras. Las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca difieren en la caspasa iniciadora que desencadena la respuesta si bien en general convergen en la misma caspasa efectora que es la caspasa-3.

La caspasa-8 es la iniciadora de la vía extrínseca de la apoptosis y se estimula por la unión de ligandos a los receptores de muerte, como Apo-1/Fas, en la membrana plasmática, provocando la formación de *clusters* del receptor, que reclutan a la caspasa-8 a través de proteínas adaptadoras, como FADD (proteína con región de muerte asociada a Fas), provocando la caspasa-3 (*Figura 13*) (*Hengartner, 2000*).

La vía intrínseca depende de la caspasa-9 y se activa por señales externas o internas, como el daño en el ADN. Las señales que activan esta vía regulan la relación citoplasmática de las proteínas de la familia de Bcl-2. Esta familia está compuesta por factores anti-apoptóticos (Grupo I) y factores pro-apoptóticos (Grupo II y III) y el correcto balance entre estos factores controla la homeostasis mitocondrial. Al activarse la vía intrínseca, el aumento de los factores pro-apoptóticos induce aumento de la permeabilidad mitocondrial conduciendo a la liberación de proteínas pro-apoptóticas de la mitocondria, como IAF o Smac/ DIABLO y, en particular, el citocromo c. De esta forma, se activa la caspasa-9, que no se activa por clivaje proteolítico, sino al asociarse con otras dos proteínas, Apaf-1 y el citocromo c. El complejo formado por caspasa-9/Apaf-

1/Citocromo c se denomina Apoptosoma y es el que activa a la caspasa-3 (Figura 13) (Hengartner, 2000).

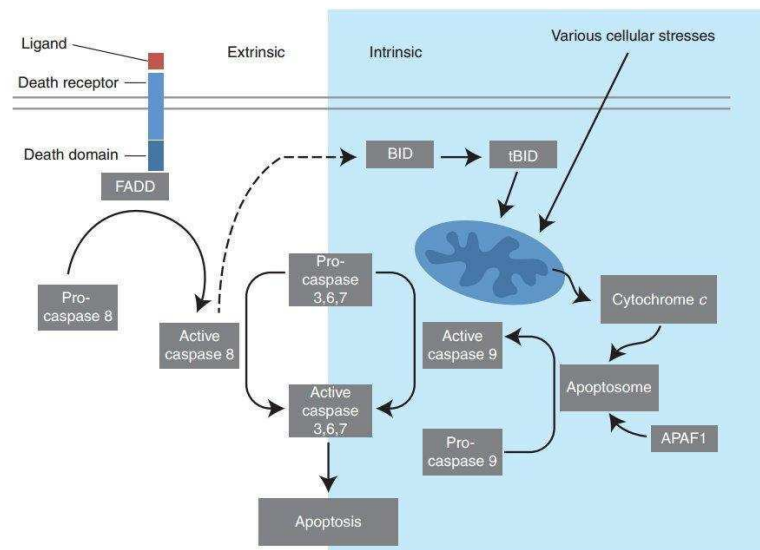


Figura 13: Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. La vía extrínseca (izquierda) se inicia por la unión de ligandos a receptores en la membrana plasmática los que, a través de proteínas adaptadoras como FADD, reclutan a la caspasa-8. La caspasa-8 se activa por autoclivaje y activa, por clivaje, a las caspasas efectoras, como la caspasa-3. La vía intrínseca (derecha) se inicia por señales externas e internas que inducen aumento de la permeabilidad mitocondrial, liberando al citocromo c. Una vez en citoplasma, el citocromo c se une a la caspasa-9 y a la proteína Apaf-1, formando el Apoptosoma. El Apoptosoma activa por clivaje a la caspasa-3 (McIlwain y col., 2013).

En los modelos experimentales de pancreatitis aguda se observó que la muerte de la célula acinar se produce por necrosis o apoptosis. La muerte de la célula acinar por necrosis es una de las complicaciones más severas de la patología. Durante la necrosis, la célula acinar promueve la respuesta inflamatoria local al liberar al medio extracelular el contenido intracelular o DAMPs (del inglés: *Damage-Associated Molecular Pattern Molecules*), propagando y exacerbando la patología. En cambio, durante la muerte por apoptosis, los componentes celulares quedan contenidos en los cuerpos apoptóticos, limitando el reclutamiento de los factores pro-inflamatorios al tejido pancreático. Consecuentemente, se observa que el grado de severidad correlaciona directamente con la extensión de la necrosis e inversamente con el grado de apoptosis. De hecho, los modelos moderados de pancreatitis aguda (pancreatitis edematosa) se asocian a una respuesta apoptótica mayor, frente a los modelos severos (pancreatitis necrotizante), que presentan mayor

extensión de la necrosis (Kaiser y col., 1995; Gukovskaya y col., 1996; Saluja y col., 1996; Sandoval y col., Bhatia y col., 1998; Gukovskaya y Pandol, 2004; Mereninova y col., 2006).

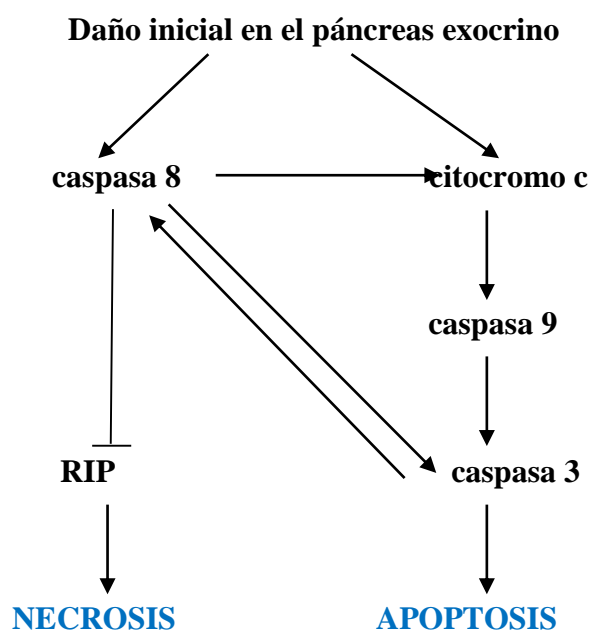


Figura 14: Participación de las vías de las caspasas en las principales formas de muerte celular en la pancreatitis aguda experimental en la rata. El daño celular durante la pancreatitis aguda induce la liberación del citocromo c y la consecuente activación de la caspasa-9 y la vía intrínseca. Asimismo, se induce la activación de la vía extrínseca a través de la caspasa-8. Se observa una activación cruzada de ambas vías a través de la caspasa-3 efectora. La estimulación de las caspasas inhibe la necrosis probablemente a través de la degradación de la proteína RIP (adaptado de Mereninova y col., 2006).

En particular, se observó que las caspasas 8 y 9 se activan rápidamente al inicio de la pancreatitis aguda en rata, evidenciando que las vías extrínseca e intrínseca se encuentran implicadas. El grado de activación de una u otra vía, o de la respuesta necrótica, estará determinado por el agente inductor y la severidad del modelo utilizado (Figura 14) (Mereninova y col., 2006).

Las caspasas también participan en otros procesos claves durante el desarrollo de la pancreatitis aguda. Se ha observado que estas enzimas tienen un efecto directo en la inhibición de la necrosis. Asimismo, se observó que inhiben la activación *in situ* del tripsinógeno y de NF- κ B, ambos factores claves en la patogénesis de la enfermedad. Se demostró que la inhibición de la actividad de las caspasas incrementa los niveles plasmáticos de amilasa y lipasa provocando asimismo un mayor influjo de neutrófilos al páncreas (Gukovskaya y col., 2002; Bhatia, 2004).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se mostró que la administración de secretina agrava el desarrollo de la pancreatitis aguda y que el ANF inhibe la respuesta mediante

la extrusión de AMPc a través del transportador MRP4 (Rodríguez y col., 2011). No obstante, se observó asimismo que el ANF reduce *per se* la activación del tripsinogeno, lo que sugiere que tendría efectos independientes de los ejercidos a nivel de secretina. Mas aun todos los grupos experimentales tratados con ANF mostraban a la microscopía óptica que los núcleos celulares presentaban aspecto picnótico, lo que sugería un posible efecto pro-apoptótico del péptido atrial.

Los distintos estudios muestran que los factores que modifican la relación necrosis/apoptosis y, en particular que estimulan la actividad de las caspasas, serían beneficiosos para el curso de la pancreatitis aguda ya que disminuirían su severidad por lo que podrían ser posibles candidatos para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

3.3- Modelos animales de pancreatitis aguda

Si bien en los últimos años se han realizado grandes avances en el estudio de la pancreatitis aguda, aún no existen tratamientos que permitan alterar el curso de la patología. Esto se debe a que, si bien se conocen los agentes etiológicos que la originan, los mecanismos fisiopatológicos moleculares que se desencadenan no están totalmente esclarecidos (Cruz-Santamaría y col., 2012). Esto obedece en parte a la compleja posición anatómica del páncreas y a la dificultad de obtener muestras de tejido humano en los distintos estadios de la patología que permitan su estudio. Por esta razón, se han desarrollado y validado distintos modelos animales, principalmente en roedores, que han brindado valiosa información fundamentalmente en relación a los mecanismos fisiopatológicos subyacentes.

A diferencia del páncreas humano que se presenta como un órgano compacto y conspicuo, el páncreas de los roedores como la rata y el ratón, es un órgano segmentado y difuso. Además, presentan diferencias anatómicas, ya que el conducto de Wirsung no se une al conducto biliar común para formar elcolédoco, sino que desemboca directamente en la empolla de Vater junto con el conducto biliar. A pesar de estas diferencias anatómicas, el páncreas de los roedores

posee los mismos tipos celulares (células acinares, ductales, centroacinares, estrelladas y células endocrinas) y presenta una fisiología similar al humano y es, por lo tanto, un buen modelo para su estudio (*Lerch y Gorelick, 2013; Hyun y Lee, 2014*). A continuación, se resumen los principales modelos animales validados utilizados para el estudio de la pancreatitis aguda. Los modelos animales de distintas patologías tienen ventajas y desventajas, pero continúan siendo una herramienta muy útil para investigar distintas enfermedades.

a) Administración de secretagogos

Este modelo se genera a través de la sobre-stimulación del páncreas por administración de secretagogos. El secretagogo más utilizado es la ceruleína, análogo de la CCK. Su interacción con los receptores de la hormona provoca la sobre-estimulación de la glándula que lleva a la activación prematura del tripsinógeno mediado por catepsina B. Entre las alteraciones fisiológicas generadas, se observa la supresión de la secreción pancreática, formación de edema, aumento de la amilasa plasmática, infiltración y vacuolización del tejido. Este modelo es ampliamente utilizado para evaluar los eventos intracelulares tempranos de la patología ya que mimetiza los sucesos que ocurren en los estadios tempranos de la enfermedad en humanos. Mas aun los cambios histológicos son muy similares a lo observado en humanos. Se administra generalmente en dosis de 40-50 µg/kg ip y la severidad del cuadro es dependiente del número de inyecciones, permitiendo generar pancreatitis edematosa o necrotizante. Es el modelo más utilizado ya que es un método no-invasivo y altamente reproducible (*Lampel y Kern, 1977; Saluja y col., 1985*).

b) Pancreatitis aguda inducida por sales biliares

Este modelo se genera por la administración de sales biliares, principalmente taurocolato de sodio (3-5%), en el conducto pancreático común y provoca pancreatitis aguda severa. Se utiliza principalmente para estudiar la etiología de la enfermedad ya que la obstrucción ductal mimetiza la pancreatitis aguda inducida por litiasis biliar. El mecanismo por el que el tarucolato de sodio

genera pancreatitis se desconoce. Si bien es un modelo altamente invasivo y de compleja generación, ya que se requiere la colocación de una cánula en el conducto, permite producir pancreatitis aguda necrotizante en un corto período de tiempo, permitiendo el estudio de las complicaciones a nivel sistémico (*Aho y col., 1980; 1983*).

c) Administración de L-arginina

El modelo se induce por una única inyección intraperitoneal de L-arginina (5 g/ Kg) y genera pancreatitis aguda necrotizante. Sin bien los mecanismos subyacentes se desconocen, se cree que el exceso de arginina inhibe la actividad de ornitina decarboxilasa que es la enzima limitante en la síntesis de poliaminas. Por otra parte, favorece la producción de óxido nítrico y la lipoperoxidación proteica. Es un método no-invasivo pero su relevancia clínica es pobre por eso no es muy utilizado (*Tani y col., 1990*).

d) Dieta deficiente en colina con suplementación de etionina (Dieta CDE)

Se genera pancreatitis mediante una dieta con bajo contenido de colina y suplementación de etionina al 0.5 % durante 4 a 6 semanas, lo que induce pancreatitis aguda hemorrágica con una tasa de mortalidad del 100 % a los 4 días. El mecanismo no se conoce claramente, pero se asume que la etionina afectaría la síntesis de ARNm y proteínas, así como también el metabolismo de los fosfolípidos. El modelo es el menos invasivo, pero tiene la desventaja de que la dieta afecta otros órganos como el hígado y el cerebro. No obstante, al tener elevada tasa de mortalidad es utilizado para evaluar la eficacia de nuevas drogas (*Lamar, 1971; Lombardi y col., 1975; Chan y Leung, 2007*).

Los modelos animales presentan limitaciones ya que, por ejemplo, la litiasis biliar y el consumo de alcohol, principales causas de la patología en humanos, no se han podido reproducir en animales de experimentación. Asimismo, la sobre-estimulación de la glándula por ceruleína o

dietas CDE no inducen pancreatitis aguda en humanos (Cruz-Santamaría y col., 2012). Sin embargo, los modelos animales de pancreatitis aguda han ayudado a dilucidar los principales mecanismos intracelulares que llevan a la activación del tripsinógeno intrapancreático, la autodigestión de la glándula y la respuesta inflamatoria generada, entre otros. Es por eso que continúan siendo una herramienta extremadamente útil y ampliamente utilizada para conocer el desarrollo e identificar blancos terapéuticos que permitan prevenir y curar la patología.

La pancreatitis aguda continúa siendo una gran preocupación médica en virtud a su curso incierto. En trabajos previos mostramos que el aumento de AMPc en estadios tempranos agrava el desarrollo de la enfermedad y el ANF es capaz de extruir el segundo mensajero y mejorar el cuadro fisiopatológico, lo que podría estar relacionado con la evolución de la enfermedad. No obstante, el ANF también presentó efectos per se sobre la activación del tripsinógeno. Si bien en las últimas décadas se han realizado enormes avances en relación a los mecanismos moleculares subyacentes en sus etapas iniciales, aún restan muchos aspectos por esclarecerse. En este trabajo de tesis ahondamos en los efectos del ANF en el páncreas exocrino a fin de ampliar el conocimiento que pueda eventualmente en un futuro contribuir al desarrollo de marcadores pronósticos y/o nuevas estrategias terapéuticas.

En trabajos previos demostramos que el ANF regula la fisiología del páncreas exocrino mediante la estimulación de la secreción de la glándula en forma dosis-dependiente. Asimismo, observamos que el péptido a través del receptor NPR-C acoplado a la vía PLC/PKC potencia el efecto secretor de la hormona secretina, uno de los principales reguladores de la funcionalidad pancreática (Sabbatini y col., 2003). Asimismo, reportamos que el ANF regula la vía de señalización de secretina al disminuir los niveles intracelulares de AMPc aumentados por la hormona y que este efecto también es mediado por NPR-C, acoplado a la vía de PLC/PKC (Sabbatini y col., 2007). El mecanismo subyacente obedece a que el ANF estimula la extrusión del segundo mensajero al medio extracelular a través del transportador MRP4 (Rodríguez y col., 2011). Mostramos asimismo que este mecanismo en parte atenúa el desarrollo de la pancreatitis aguda a través de la disminución de la amilasa plasmática, la activación del tripsinogeno y la mejora en el perfil histopatológico en animales pre-tratados con ANF previo a la inducción de la patología (Ventimiglia y col., 2015).

Estos antecedentes, así como también los estudios realizados en células del sistema inmune en los que se muestra que el ANF reduce parámetros inflamatorios (De Vito, 2004), permiten proponer la siguiente hipótesis general de trabajo:

El ANF es sintetizado en el páncreas exocrino y posee un papel protector en las etapas tempranas de la pancreatitis aguda.

A fin de cumplimentar la hipótesis enunciada se propone el siguiente objetivo general:

Determinar si el ANF es sintetizado en el páncreas exocrino y si posee un papel protector en los eventos iniciales que conducen al desarrollo de la pancreatitis aguda focalizando el estudio en la respuesta inflamatoria y la muerte celular.

Objetivos específicos

Con el propósito de abordar el estudio del posible papel protector del ANF en los eventos tempranos de la pancreatitis aguda, nos proponemos estudiar su participación en la respuesta inflamatoria y en los mecanismos que conducen a la muerte celular utilizando para tal fin un modelo animal validado y equivalente a la pancreatitis aguda humana en estadios iniciales (*Dabrowski, 1999; Chan y Leung, 2007*). Se proponen los siguientes objetivos específicos:

1-Determinar el efecto del ANF sobre la expresión y/o actividad de los principales mediadores y amplificadores de la respuesta inflamatoria en la pancreatitis aguda.

2-Evaluar la participación del ANF en el proceso de apoptosis en la pancreatitis aguda.

3-Relacionar los hallazgos que deriven de los objetivos previamente señalados con observaciones a nivel de la ultraestructura del páncreas.

4-Determinar si el ANF es sintetizado en el páncreas exocrino.

1- ANIMALES

Los estudios se realizaron en ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 180 a 210 g de peso corporal provenientes del bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (22°C–24°C) y humedad relativa (50 ± 2%) con ciclos alternados de luz/oscuridad (luz de 7:00 a 19:00 h).

Todos los protocolos fueron aprobados por Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL-FFyB), conforme a las recomendaciones formuladas por El National Institutes of Health para el cuidado y uso de animales de laboratorio (*NIH Publication N° 85-23 1985, revisada en 1996*).

Los animales recibieron comida y bebida *ad libitum* y 12 horas previas al inicio de cada experimento se ayunaron para evitar la liberación de hormonas o péptidos que pudieran modificar la funcionalidad digestiva. Se utilizó etiluretano (1.2 g/Kg, ip) como agente anestésico y la eutanasia se realizó por decapitación del animal anestesiado.

2- DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el objetivo de estudiar el papel del ANF en la respuesta inflamatoria en la etapa temprana de la pancreatitis aguda, tanto el ANF como la hormona secretina, se administraron por infusión comenzando 30 min antes de generar el modelo animal de pancreatitis aguda, de acuerdo al protocolo que se detalla en el párrafo siguiente y se esquematiza en la Figura 15.

El ANF (American Peptide, CA, USA) y/o secretina (American Peptide, CA, USA), se infundieron a través de una cánula en la vena yugular (PE 50), mediante bomba de infusión (0,1 ml/ h) durante 60 min. Se utilizó una dosis de ANF de 1 µg/h/Kg y secretina de 1 UI/h/Kg

obtenidas a partir de las curvas dosis-respuesta obtenidas en trabajos previos de nuestro laboratorio (Sabattini y col., 2003; 2007).

Para inducir el modelo animal de pancreatitis aguda en rata, se utilizaron inyecciones repetidas de ceruleína (Sigma Chem Co, St Louis, MI, USA), análogo de la colicistokinina (CCK) (Hyun, 2014). Se administraron cuatro inyecciones intraperitoneales (ip) de 40 $\mu\text{g/h/Kg}$, inyectando la primera 30 min luego de iniciada la administración de ANF, secretina o la combinación de ambos péptidos, de manera de evaluar efectos sobre eventos tempranos de la pancreatitis aguda. Los animales se sacrificaron a los 60 min posteriores a la última inyección de ceruleína y se obtuvieron muestras de sangre y tejido pancreático para realizar estudios bioquímicos, de microscopía y de biología molecular (Figura 15).

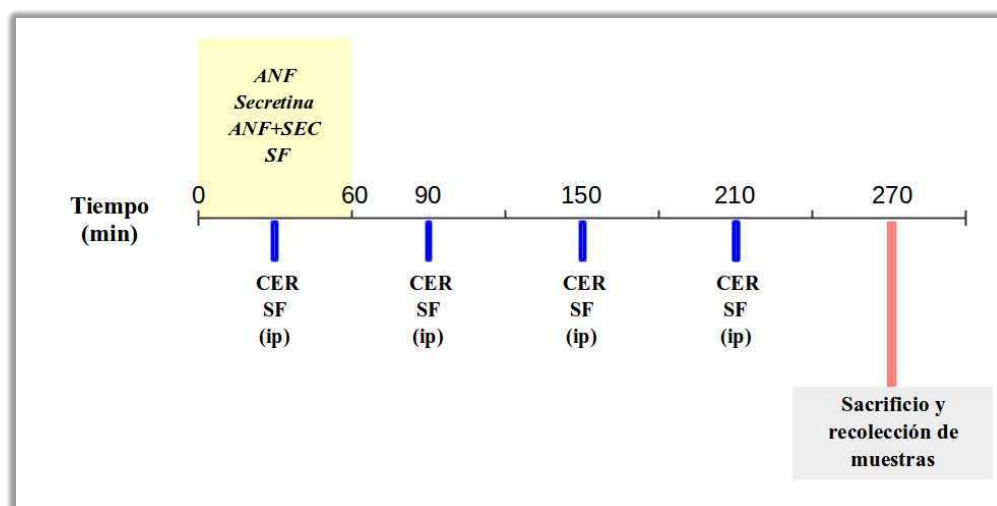


Figura 15: Diseño experimental. Los animales anestesiados se infundieron con ANF (1 $\mu\text{g/h/Kg}$), secretina (SEC) (1 UI/h/Kg), la combinación de ambos o solución fisiológica (SF) mediante una cánula en la vena yugular durante una hora. La pancreatitis aguda se indujo mediante 4 inyecciones intraperitoneales (ip) de ceruleína (CER) (40 $\mu\text{g/h/Kg}$) espaciadas por una hora o SF. La primera inyección se aplicó 30 min después de iniciada la infusión de los péptidos de forma de evaluar sus efectos tempranos en el desarrollo de la pancreatitis aguda. Una hora después de la última inyección de CER los animales se sacrificaron y se recolectaron las muestras, como se detalla en el texto.

3- MÉTODOS

3.1- Determinación de la actividad de la amilasa plasmática

La determinación de amilasa plasmática es un parámetro bioquímico empleado para diagnóstico de pancreatitis aguda. Su elevación en plasma es un indicador de daño acinar, su valor alcanza en la patología, tanto en humanos como animales, valores de más de tres veces su valor normal.

Las muestras de sangre recogidas en heparina se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min, separándose el plasma que se conservó a -20 °C hasta su análisis. La determinación se realizó utilizando el kit comercial Amilasa 405 línea líquida AA de Wiener lab (Rosario, Argentina) siguiendo las especificaciones del fabricante. El método emplea el sustrato 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido (CNP-G3), que en presencia de amilasa libera 2-cloro-p-nitrofenol (CNP), formándose 2-cloro-nitrofenil- α -D-maltriósido (CNP-G2), maltotriosa (G3) y glucosa. El CNP absorbe a 405 nm y la velocidad de aparición del color es directamente proporcional a la actividad enzimática. Las lecturas se realizaron a 37 °C. Las muestras se midieron por duplicado y los resultados se expresan como porcentaje de incremento respecto del control.

3.2- Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Se realizó una curva de calibración con concentraciones crecientes de BSA (0 a 9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Los estándares y las muestras se incubaron durante 10 min con 200 μl de reactivo de Bradford (0.01% Azul Brillante de Coomassie G250, etanol 4.7% y ácido fosfórico 8.5%) y las absorbancias se midieron a 580 nm (Labsystems Multiskan MS). Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

3.3- Ensayos de Western Blot

Para evaluar la expresión o cantidad relativa de determinadas proteínas en los distintos tratamientos, se utilizó la técnica de Western Blot, según se detalla a continuación:

a) Procesamiento de las muestras

Luego de sacrificar el animal, el tejido pancreático obtenido se homogenizó en buffer de lisis (Tris-HCl 200 mM; EDTA 5 mM; NaF 25 mM; Triton x-100 1%) utilizando un homogenizador automático (IKA T-10 basic, Ultra-Turrax, Colonia, Alemania) con cocktail inhibidor de proteasas (Sigma Chem Co, St Louis, MI, USA) e inhibidor de tripsina (Sigma Chem Co, St Louis, MI, USA). Una vez homogenizadas, las muestras se dejaron reposar durante 40 min en agitación seguidas de centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

b) Desnaturalización de proteínas:

Las proteínas se desnaturalizaron por incubación en buffer Laemmli 2X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6.8; glicerol 25%; SDS 2%; azul de bromofenol 0.01%; β -mercaptoetanol 5%) a 100 °C durante 5 min.

c) Corrida electroforética y transferencia:

Las muestras se sembraron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-bisacrilamida (30% y 0.8%, respectivamente). Se utilizaron geles del 8 al 15% de la mezcla de acrilamida dependiendo del peso de la proteína de interés. La corrida se realizó en cuba electroforética (Biorad Lab. CA, USA) a 90 V en buffer de electroforesis (Tris 25 mM, pH 8.3; glicina 192 mM; SDS 0.1%). Una vez finalizada la corrida, se realizó la transferencia a membrana de PDVF (Pierce/ Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) por método húmedo en buffer de transferencia (Tris 25mM pH 8.3; glicina 192 mM; metanol 20%; SDS 0.1%) durante 90-120 min a 400 mA en frío.

c) Immunoblotting:

Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5 % en TBS-T durante 60 min con agitación. Se realizaron lavados de 10 min con TBS-T para eliminar el exceso de leche y se incubaron las membranas durante toda la noche con anticuerpo primario a 4° C. Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la Tabla II. Las membranas se lavaron posteriormente con TBS-T durante 3 min (3 lavados) y se incubaron con anticuerpo secundario durante 60 min a temperatura ambiente y en agitación. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-conejo IgG conjugado a HRP W401B (Promega, Madison, WI, USA) y anti-ratón IgG conjugado a HRP sc-2005 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA).

Luego de realizar lavados de 10 min con TBS-T y TBS, se revelaron las membranas con el reactivo quimioluminiscente comercial Bio-Lumina (Kalium Technologies, Buenos Aires, Argentina) por exposición en placa radiográfica o mediante la detección digital en el equipo GeneGnome XRQ (Syngene, MD, USA). Se utilizó como control de carga ERK1/2 total ante la imposibilidad de utilizar actina, en virtud a que distintos estudios muestran que la expresión de actina se incrementa significativamente en la pancreatitis aguda (*Yuan y col., 1999; Samuel y col., 2006*).

3.4- Obtención de fracciones nucleares

Para determinar el grado de actividad del factor de transcripción pro-inflamatorio NF- κ B se midió la translocación al núcleo de su subunidad RelA o p65, una de las principales subunidades activas durante el desarrollo de la pancreatitis aguda (*Gukovsky y col., 1998*). Para ello, las muestras de tejido pancreático se sometieron a un fraccionamiento diferencial a fin de obtener fracciones enriquecidas en núcleos y fracciones enriquecidas en citoplasmas de acuerdo al protocolo descrito por Vaquero y colaboradores, con modificaciones (*Vaquero y col., 2001*). Para realizar el fraccionamiento celular se emplearon las siguientes soluciones:

- Buffer SHB: Hepes 10 mM, pH 7.9, KCl 15 mM, EDTA 2 mM y sacarosa 0.25 mM.
- Solución A: Hepes 10 mM, pH 7.9; MgCl₂ 1.5 mM; KCl 10 mM.
- Solución B: Hepes 10 mM, pH 7.9; MgCl₂ 1.5 mM; EDTA 0.2 mM; Glicerol 20%; KCl 0.42 M.
- Solución C: Hepes 10 mM; KCl 60 mM; Glicerol 20%; EDTA 0.25 mM; EGTA 0.125 mM.

Antígeno	Especie	Dilución (TBS 1% BSA)	Marca
COX2	Conejo	1/500	Abcam (ab15191)
Caspasa-3	Conejo	1/1000	Santa Cruz (H-277 sc-7148)
p-ERK	Ratón	1/500	Santa Cruz (E-4 sc-7383)
ERK1	Conejo	1/1000	Santa Cruz (K-23 sc-94)
iNOS	Conejo	1/750	Abcam (15323)
NPR-C	Conejo	1/1000	Santa Cruz (H-300 sc-25487)
PPAR γ	Conejo	1/1000	Abcam (ab19481)
ANF	Conejo	1/1000	Cedido por el Dr. Victor Casco
Lámina A	Conejo	1/1000	Santa Cruz (H-102 sc-20680)
NF- κ B (p65)*	Ratón	1/500	BD (610868)

Tabla II: Descripción de los anticuerpos primarios utilizados. *El factor de transcripción NF- κ B, a diferencia de las otras proteínas, se determinó en fracciones nucleares como se detalla en el texto. El anticuerpo primario de ANF fue cedido por el Dr. Víctor Casco director del Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LAMAEC) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos.

Se homogenizaron aproximadamente 200 mg de tejido pancreático con émbolo en 500 μ l de solución SHB e inhibidores de proteasas seguido de centrifugación a 4000 g durante 10 min a 4 °C. El pellet conteniendo las células, se resuspendió en 400 μ l de Solución A con inhibidores de proteasas y se homogenizó nuevamente con émbolo. Para disgregar la membrana plasmática,

se agregaron 500 μ l de Solución A con inhibidores de proteasas y detergente NP40 al 1%. Se dejó actuar en frío durante 3 min, mientras se resuspendía por inversión. Se centrifugó a 4.000 g durante 10 min a 4 °C y se guardó el sobrenadante conteniendo la fracción citoplasmática a -80 °C para posteriores estudios y el pellet se lavó con Solución A sin detergente en presencia de inhibidores de proteasas. Luego de los lavados se centrifugó a 4.000 g durante 10 min a 4 °C, se resuspendió el pellet en 200 μ l de Solución B y se dejó en agitación durante 20 min en frío para lisar las membranas nucleares. Se centrifugó a 18.000 g durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante, conteniendo la fracción nuclear, se diluyó en Solución C con inhibidores de proteasas a fin de disminuir la concentración de sales y evitar que interfiera en la determinación por Western Blot.

Para corroborar la eficiencia del fraccionamiento y la calidad de las fracciones citosólicas y nucleares obtenidas, se realizó Western Blot de las muestras enriquecidas en núcleos utilizando anticuerpo anti-actina (Sigma Chem Co, St Louis, MI, USA), proteína presente mayoritariamente en citosol. En las fracciones enriquecidas en citoplasma se realizó un Western Blot con anticuerpo anti-lámina A/C (Santa Cruz Biotechnology, USA), proteínas nucleares. Una vez corroborada la correcta obtención de las preparaciones enriquecidas en citoplasma y núcleos, se procedió a la cuantificación de la subunidad p65 por el método de Western Blot como se detalló en los párrafos precedentes.

3.5- Determinación de los niveles intrapancreáticos y plasmáticos de TNF- α

Los niveles de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α se determinaron en muestras de tejido pancreático y plasma por ensayo de adsorción (ELISA) mediante la utilización de un kit comercial (BD OptEIA Rat TNF ELISA Kit) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las muestras (200 mg de tejido) se homogenizaron en buffer de lisis (Tris-HCl 200 mM; EDTA 5 mM; NaF 25 mM; Triton x-100 1%) en presencia de inhibidores de proteasas (Sigma Chem Co, St Louis, MI, USA) utilizando un homogenizador automático (IKA T-10 basic, Ultra-

Turrax, TX, USA). La curva de calibración se realizó mediante diluciones seriadas a partir de una solución madre de 2000 pg/ml de TNF- α . Las muestras y diluciones de la curva se sembraron por duplicado en la placa provista por el kit conteniendo el anticuerpo adsorbido, previo al agregado de 50 μ l de solución diluyente (ELISA Diluent). Se selló la placa con papel film y se incubó durante 120 min a temperatura ambiente. Los pocillos se vaciaron luego por inversión y se realizaron 5 lavados (5 minutos cada uno) con 300 μ l de solución de lavado y se agregaron 100 μ l de solución de detección del anticuerpo. Se incubó durante 60 min a temperatura ambiente, se realizaron 5 lavados y se agregó 100 μ l de solución de trabajo con la enzima por pocillo, se selló la placa y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de lavados. Luego, se agregaron 100 μ l de la solución TMB-One Step conteniendo el substrato enzimático y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se frenó mediante el agregado de 50 μ l de solución stop y se leyó la absorbancia a 405 nm dentro de los 30 min. Los valores de cada muestra fueron relativizados a cantidad de proteína. Los resultados se expresaron como pg TNF- α / μ g proteína.

3.6- Determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa

Para evaluar el grado de infiltración neutrofílica en el páncreas, se midió la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) (Bhatia y col., 2003). Esta enzima durante la inflamación convierte el cloruro en peróxido de hidrógeno que es un potente oxidante (Yang y col., 2015).

a) Aislamiento de la enzima:

Se homogenizaron aproximadamente 100 mg de tejido pancreático en 1 ml de buffer fosfato (PBS) 20 mM (pH 7.4) y se tomó una alícuota para la cuantificación de ADN. El homogenato se centrifugó a 13.000 g durante 10 min a 4° C y el pellet obtenido se resuspendió suavemente con pipeta en 1 ml de solución 0.5 % de bromuro de hexadecilmetilamonio (CTAB) en PBS 50 mM (pH 6.0). La solución se sometió a 4 ciclos de congelado-descongelado y se sonicó

durante 4 segundos en hielo a 20 kHz, 500 W. Se centrifugó a 13.000 g durante 10 min a 4° C y se conservó el sobrenadante para evaluar la actividad de la enzima.

b) Determinación de la actividad enzimática:

Se agregó 50 µl de la enzima extraída e igual volumen de solución TMB sustrato para ELISA (Sigma Chem Co, St Louis, MI, USA) incubándose durante 2 min a 37° C. La reacción se detuvo mediante el agregado de 50 µl de H₂SO₄ 2N. Se leyó la absorbancia a 450 nm y los valores se normalizaron al contenido inicial de ADN en cada muestra.

c) Cuantificación de la cantidad de ADN

El ADN se cuantificó por fluorimetría utilizando el colorante Hoechst 33256 al 0,1 %. Se tomaron 10 µl del homogenato inicial de cada muestra y se incubaron con 90 µl del colorante. La curva estándar (0 a 0,4 µg/ml) se realizó con ADN comercial de testículo de salmón (Ambion Inc. CA, USA). Las muestras y la curva se incubaron en placa multipocillos durante 10 min y las lecturas se realizaron en fluorómetro (FlexStation III, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (λ Excitación: 360 nm; λ Emisión: 450 nm).

3.7- Determinación de los niveles de prostaglandina E₂ (PGE₂) intrapancreática

Se determinaron los niveles intrapancreáticos de la prostaglandina pro-inflamatoria PGE₂, principal producto de la enzima COX-2, por radioinmunoensayo (RIA), como se detalla a continuación.

a) Procesamiento de las muestras

Se homogenizaron aproximadamente 200 mg de tejido en 1,5 ml de etanol absoluto para extraer la prostaglandina, mediante homogenizador automático (IKA T-10 basic, Ultra-Turrax, TX, USA). Las muestras se incubaron durante 120 min a 4 °C y se centrifugaron a 9.500 g durante 10 min a 4 °C conservándose el sobrenadante. El pellet se lavó en 0,5 ml de etanol absoluto y se centrifugó a 9.500 g durante 10 min a 4 °C. Este sobrenadante y el previamente obtenido se

juntaron y el alcohol se evaporó en rotavap (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Las muestras obtenidas se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

b) *RIA*

Las muestras se reconstituyeron en PBS 0,01M (pH 7,4), conteniendo NaCl 0,15 M, seroalbúmina bovina (BSA) 0.1% y azida sódica 0.1%. Las muestras y los estándares se incubaron con 100 µl de antisuero (anti-PGE₂) (Sigma Aldrich, St. Louis, Mi USA) durante 30 min a 4 °C, seguido del agregado de 100 µl del trazador ([³H]-PGE₂) (New England Nuclear TM Life Science Product, Boston, MA USA) (aproximadamente 8.000 cpm/ 100 µl). La incubación se continuó por 60 min a 4 °C. Las formas unidas y libres se separaron utilizando una suspensión de carbón-dextran (1%:0,1% respectivamente) dejándose reposar 10 min a 4 °C, seguido de centrifugación durante 15 min a 3.200 rpm a 4 °C. La radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido (Packard Tri-Carb, USA).

La sensibilidad del ensayo fue de 10 pg/tubo, teniendo una reactividad cruzada de PGE₂ y PGE₁ de 100% y menos de 0,1% con otras PGs. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 8,2 y 12%, respectivamente. Los resultados se expresan como pg de PGE/mg tejido.

3.8- Determinación de la actividad de las enzimas caspasas

Para evaluar la actividad de las enzimas caspasas-2, 3, 8 y 9 se utilizó el kit comercial ApoAlert Caspase Assay Plates (Clontech, Mountain View, CA, USA). La actividad de las enzimas se determinó fluorométricamente por clivado del colorante 7-amino-4-metilcumarina (AMC) unido covalentemente a los substratos específicos de cada caspasa (VDVAD para caspasa-2; DEVD para caspasa-3; IETD para caspasa-8 y LEHD para caspasa-9). En presencia de la enzima el colorante AMC es clivado y liberado emitiendo fluorescencia con un pico máximo a 460 nm. De esta forma, la actividad enzimática se correlaciona directamente con el aumento de fluorescencia. En la placa de 96 pocillos provista por el fabricante se agregaron 50 µl de buffer de

reacción 2X con DTT (incluido en el kit). Se selló con papel parafilm y se incubó durante 5 min a 37° C para solubilizar el sustrato adsorbido. Se agregaron 50 µl de la muestra en buffer de lisis (conteniendo 50 µg de proteínas), se selló con papel parafilm incubándose durante 120 min a 37° C. La detección se realizó en fluorómetro (FlexStation III, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (λ Excitación: 380 nm; λ Emisión: 460 nm). El registro se realizó durante 60 min tomando mediciones cada 10 min. Los valores obtenidos se expresaron como porcentaje respecto del control.

3.9- Obtención de acinos pancreáticos aislados

Los acinos pancreáticos se aislaron acorde a la técnica descrita por Williams y colaboradores (*Williams y col., 1978*). Las ratas ayunadas se sacrificaron por decapitación entre las 10.30 y 11.00 hs y se extrajo rápidamente el tejido pancreático que se colocó en hielo frío en una solución de Krebs suplementada, conteniendo inhibidor de tripsina (0,1 mg/ml), y gaseada con carbógeno (95 % O₂/5 % CO₂) y se removió el tejido graso y los nódulos linfáticos del páncreas. La composición de la solución de Krebs suplementada (pH: 7,4) fue la siguiente: NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,5 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 14 mM y suplemento mínimo de aminoácidos y vitaminas (GIBCO, Life Technologies, NY, USA). El aislamiento se realizó acorde a las siguientes etapas:

- *Digestión*: Se utilizó el medio anteriormente descrito adicionado con 60-75 U/ml de colagenasa purificada, 0,03-0,05 mg/ml de quimiotripsina, 1,8 mg/ml de hialuronidasa (Sigma Chem. Co, USA), 2 mg/ml de BSA (medio de disociación). El medio se inyectó en el parénquima pancreático (5 ml) con una jeringa 27-g seguido de agitación en un Erlenmeyer de policarbonato durante 15 min (70 ciclos/min). Luego de descartar el exceso del medio, se agregaron 5 ml de medio de disociación fresco incubándose durante 45-50 min en las mismas condiciones experimentales. La disociación del tejido se realizó mediante la utilización de pipetas de polipropileno de distintos

diámetros seguido de una filtración con una malla de 150 μm .

- *Lavado*: Los acinos se lavaron utilizando 10 ml de solución de Krebs suplementada fría libre de enzimas conteniendo BSA al 1 %.

- *Purificación*: Los acinos se centrifugaron a 50 g durante 4 min utilizando 10 ml de solución de Krebs suplementada sin enzimas en presencia de 4 % de BSA seguido de un lavado en el mismo medio.

Los acinos pancreáticos se resuspendieron finalmente en una solución de Krebs suplementada sin enzimas en presencia de 0,5 % de BSA para ser utilizados en la extracción de ARN total como se detalla a continuación.

3.10- Extracción de ARN total y transcripción reversa

La extracción de ARN total a partir de los acinos aislados se realizó mediante el kit de purificación de ARN MasterPure (Epicenter Biotechnologies, WI, USA). Para eliminar el ADN genómico remanente las muestras se trataron con DNAase I (RQ1, Invitrogen, CA, USA). La cuantificación del ARN obtenido se realizó por espectrofotometría a 260 nm y a través de la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm ($A_{260/280}$) y su calidad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. En una etapa siguiente se llevó a cabo la transcripción reversa mediante el agregado de 200U de MML-V de transcriptasa reversa (Fermentas Life Sci, UK), 50 pg de OligodT₁₅ (Biodynamics SRL, Argentina), inhibidor de RNAasa (Invitrogen, CA, USA) y 2 μg de las muestras de ARN, obteniéndose los ADNc de las muestras.

3.11- Técnica de PCR

Las muestras de ADNc se utilizaron para determinar la presencia del ARNm del ANF en el páncreas exocrino de rata mediante la técnica de PCR. Para la reacción de PCR se utilizó mix conteniendo el primer *forward* (CGTATACAGTGCGGTGTCCA) y *reverse*

(ATCTATCGGAGGGGTCCCAG) (125 ng), 3,5 U de enzima TaqPolimerasa (Promega, WI, USA) y buffer de reacción 5X. El protocolo de PCR consistió en la desnaturalización a 95° C durante 10 min, *annealing* a 65° C durante 30 seg y la extensión a 72° C durante 30 s, durante 35 ciclos. La reacción se realizó en termociclador automático (Eppendorf Mastercycler, USA). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio.

3.12- Obtención de cortes histológicos para microscopía óptica y de fluorescencia

Las muestras de páncreas se fijaron en buffer formol 10% durante 24 h y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 4 micras de espesor mediante la utilización de un micrótopo. Los cortes se desparafinaron con dos pasajes en xilol de 10 min cada uno y se rehidrataron por pasajes en concentraciones decrecientes de alcohol: etanol 96% (x2), etanol 70%, etanol 50%. Los cortes se lavaron en solución fisiológica y en PBS 1X.

Los cortes rehidratados se utilizaron para microscopía de inmunofluorescencia y para la realización de la técnica de TUNEL, como se explica a continuación.

3.12a- Microscopía de Inmunofluorescencia

Luego de la rehidratación, los cortes se permeabilizaron con Tritón X100 0,1% (Promega, Madison, Wi, USA) en PBS 1X durante 15 min. Los sitios inespecíficos se bloquearon con suero normal de cabra 1:20 (Vector, Burlingame, CA, USA) en PBS 1X durante 45 min. Luego de incubar los cortes con anticuerpo primario toda la noche en cámara húmeda a 4 °C se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 min cada uno y se incubó con anticuerpo secundario durante 120 min a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscuridad. Los cortes lavados con PBS 1X se montaron con solución de montaje Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-ANF y anti-NTCP detallados en la Tabla II y los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo conjugado a Cy3 hecho en cabra (Chemicon, X) en dilución 1:50

o anti IgG de conejo conjugado a FITC hecho en cabra (Jackson, West Grove, PA, USA) en dilución 1:200. Los núcleos se tiñeron con Hoescht y las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio de fluorescencia (Olympus Bx51).

3.12b- Técnica de TUNEL

Para la cuantificación de núcleos apoptóticos se utilizó la técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*). Durante la apoptosis las endonucleasas nucleares digieren el ADN oligonucleosomales en fragmentos de aproximadamente 180-200 pb. Esta técnica permite marcar los extremos 3'-OH libres de ADN por incorporación de nucleótidos biotilados a través de la enzima rTdT (terminal deoxynucleotidyl transferase). Se utilizó un kit comercial (Promega DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System, Promega, Madison, Wi, USA). Luego de la rehidratación, los cortes se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 30 min seguido de dos lavados de 5 min en PBS 1X. Las muestras se permeabilizaron utilizando proteinasa K 20 µg/ml durante 30 min, se lavaron con PBS 1X y se volvieron a fijar con paraformaldehído al 4% durante 15 min, seguido de dos lavados con PBS de 5 min a temperatura ambiente. Los preparados se equilibraron en buffer de reacción (cacodilato de sodio 200 mM, pH 6,6; Tris-HCl 25 mM, pH 6,6; DDT 0,2 mM; BSA 0,25 mg/ml; CoCl₂ 2,5 mM) durante 10 min. Para marcar los núcleos, los cortes se incubaron con 30 µl de mix de reacción conteniendo la enzima rTdT y los nucleótidos biotiniliados durante 60 min a 37° C. El control negativo se realizó omitiendo la enzima. La reacción se detuvo sumergiendo los cortes en solución de stop (NaCl 300 mM; citrato de sodio 32 mM; pH 7,2). Luego de lavar con PBS 1X, se incubó con H₂O₂ 0,3% en PBS 1X durante 3-5 min a temperatura ambiente para bloquear la peroxidasa endógena, se lavó con PBS 1X y se incubó 30 min con streptavidina-HRP a temperatura ambiente. El revelado se realizó con diamino-bencidina durante 7 min seguido de lavados con agua deionizada. Los núcleos se contra-tiñeron con hematoxilina durante 10 seg y los cortes se lavaron con agua corriente. La deshidratación se realizó

mediante lavados de 5 min en etanol de graduación creciente (50%, 70% y 96% x2). Se realizaron dos pasajes en xileno por 2-5 min y los cortes se montaron con bálsamo de Canadá (Biopack, Buenos Aires, Argentina). Los cortes se visualizaron por microscopio óptico (Olympus Bx51, Tokio, Japón). Se realizaron dos cortes por preparado y se tomaron diez fotos por corte (600X). Se cuantificaron los núcleos marcados (apoptóticos) cada 1.000 células acinares (Mareninova y col., 2006).

3.13- Obtención de cortes histológicos para estudios microscopia electrónica

Se tomaron muestras de la zona del cuello del páncreas para realizar estudios de ultraestructura y ensayos de inmunogold, como se detalla a continuación.

3.13a- Estudios de ultraestructura.

Las muestras se pre-fijaron en paraformaldehído al 3% (0,25 grados biológicos) (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 24 h a 4° C. Luego se realizaron dos lavados y se mantuvieron en buffer sacarosa 0,32M en PBS 0,1M (pH 7,4) durante 24 h a 4° C. La post-fijación se realizó con OsO₄ al 1,5% en el mismo buffer durante 2 h a 4° C, se lavaron los cortes y se tiñeron con acetato de uranilo al 2% durante 16 h a 4° C. Luego los tejidos se deshidrataron utilizando concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 80%, 96% y 100% x6). La pre-inclusión se realizó primero en una solución de partes iguales de la resina comercial Spurr Low Viscosity (Ted Pella, Redding, CA, USA) y acetona durante 2 h y luego con resina pura durante 16 h a 4°. La inclusión definitiva se realizó en cápsula de gelatina doble cero incolora y la polimerización se realizó a 60° C durante 24 h. Mediante la utilización de un ultramicrotomo (Sorvall Porter-Blum MT-1, MA, USA) se realizaron cortes ultrafinos de 60 nm los que fueron recogidos en grillas de cobre de 300 mesh, se dejaron secar y se tiñeron con acetato de uranilo al 1% durante 15 seg seguidos de una segunda

tinción con solución de Raynolds durante 15 seg. Los tejidos se visualizaron en microscopio electrónico de transmisión (TEM Zeiss EM109T, Alemania).

3.13b- Inmuomarcación con partículas de oro coloidal

Los cortes se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS 0,1M (pH 7,4) con glutaraldehído al 0,5% (0,25 grados biológicos) (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 24 h a 4 °C. Se realizaron 2 lavados de 20 min con glicina al 0,15% en PBS 0,1M (pH 7,4) y se mantuvieron en buffer sacarosa 0,32M en PBS 0,1M (pH 7,4) durante 24 h a 4 °C. Los cortes se deshidrataron por pasaje en etanol 50% durante 15 min, etanol 70% con ácido túngstico al 1% durante 20 min y 2 pasajes en etanol 70% de 10 min cada uno. Para la inclusión se utilizó resina epoxy (RL White Acrylic Resin, Sigma Co, St Louis, MI, USA) y se catalizó con peróxido de benzilo con diclohexil ftalato (Sigma Chem. Co, USA). La inclusión se realizó en 3 etapas: *i*) incubación con partes iguales etanol 70% y la resina epoxy en agitación 60 min a temperatura ambiente; *ii*) incubación con alcohol 70% al 30% y resina epoxy al 70% en agitación 60 min a temperatura ambiente; *iii*) incubación en resina epoxy pura a 4 °C durante 16 h. La inclusión definitiva se realizó en cápsulas de resina doble cero incoloras (Gelatin Capsule, Electron Microscopy Science, VWR, USA). La polimerización se realizó a 55 °C durante 24 h. Mediante la utilización de un ultramicrotomo (Sorvall Porter-Blum MT-1, MA, USA) se realizaron cortes ultrafinos de 60 nm los que fueron recogidos en grillas de cobre de 300 mesh. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con suero normal de cabra (SNC) al 3% en TBS 0,05M durante 60 min a temperatura ambiente. Se utilizó anticuerpo primario anti-ANF, descrito en la *Tabla II*, en dilución 1:50 en TBS-T 0,1% con SNC al 3% y BSA al 1%. Se incubó durante 16 h en cámara húmeda a 4 °C. Se realizaron 6 lavados con TBS-T al 0,1% de 3 min cada uno y se incubó con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con partículas de oro de 5 o 10 nm (Anti-Rabbit IgG gold-conjugate, Sigma Chem. Co, USA) durante 60 min a temperatura ambiente. Se realizaron 6 lavados de 3 min cada uno y se realizó

una tinción de contraste con acetato de uranilo al 0,5% durante 10 seg. Las imágenes se tomaron con microscopio electrónico de transmisión (TEM Zeiss EM109T, Alemania).

4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido por el test de Student-Newman-Keuls. Los resultados se expresaron como la media \pm S.E.M (Instat, Graph Pad, San Diego, USA). Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

1- EFECTOS DEL ANF SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA PANCREATITIS AGUDA

La activación del tripsinógeno y del factor de transcripción NF-κB constituyen los eventos iniciales que desencadenan la pancreatitis aguda de manera independiente. En estudios previos demostramos que el ANF disminuye la activación del tripsinógeno por lo que se decidió evaluar si tenía efecto a nivel de la respuesta inflamatoria. Con ese propósito se determinaron distintos parámetros inflamatorios en los distintos grupos experimentales cuyos resultados se detallan a continuación.

La determinación de amilasa plasmática validó el modelo utilizado y comprobó resultados previos (UI/l, $X \pm S.E.M.$): control: 190 ± 22 ; ANF: 156 ± 33 ; secretina: 190 ± 32 ; secretina + ANF: 170 ± 23 ; ceruleína: $844 \pm 37^{***}$; ceruleína + secretina: $980 \pm 32^{***\#}$; ceruleína + ANF: $659 \pm 57^{***\#\zeta}$; ceruleína + secretina + ANF: $660 \pm 32^{***\#\zeta}$ (***: $p < 0,001$ vs. control; #: $p < 0,05$ vs. ceruleína; ζ : $p < 0,05$ vs. ceruleína + secretina).

1.1- El ANF reduce la translocación a núcleo del factor de transcripción NF-κB

Se evaluó en primer término si el ANF modificaba la activación del factor de transcripción NF-κB, mediador inflamatorio disparador de la respuesta inflamatoria en la pancreatitis aguda. En condiciones normales las dos subunidades que conforman este factor se encuentran secuestradas e inactivas en el citoplasma por los miembros de la familia de los inhibidores IκB (Shih y col., 2011). En la pancreatitis aguda p65 (RelA), una de las principales subunidades activas del factor de transcripción, transloca al núcleo para inducir la expresión de citoquinas y enzimas pro-inflamatorias (Gukovsky y col., 1998).

La expresión de la subunidad p65 en la fracción nuclear resultó significativamente mayor en todos los grupos tratados con ceruleína (Figura 16). Si bien como demostramos previamente, la secretina agrava la patología, llamativamente, la activación de NF-κB fue menor en presencia

de la hormona. Asimismo, el ANF disminuyó significativamente la translocación a núcleo de p65 en los animales con pancreatitis aguda tanto en presencia como en ausencia de la secretina. Así, el péptido natriurético tendría un efecto atenuador de la respuesta inflamatoria en forma independiente de la hormona.

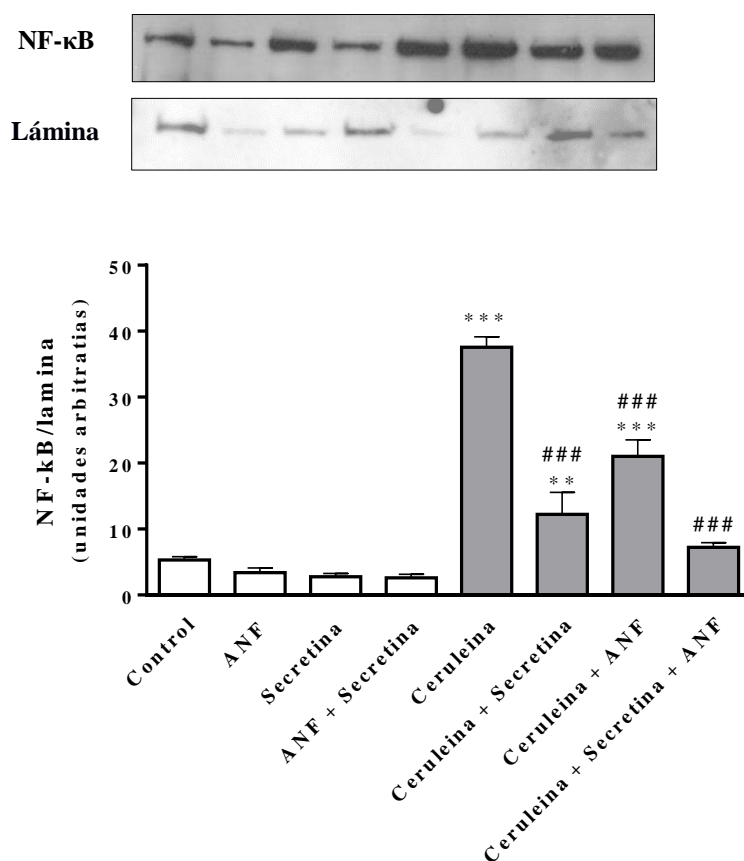


Figura 16: Expresión de la subunidad p65 (RelA) del factor de transcripción NF-κB. La expresión de RelA (65 kDa) se realizó en extractos nucleares de páncreas como se detalla en Materiales y Métodos. Panel superior: Western Blot representativo de la expresión de p65 y lámina (69 kDa). Panel inferior: Análisis densitométrico expresado en unidades arbitrarias de la relación NF-κB (p65) /lámina. **: p<0.01 y ***: p<0.001 vs. control; ###: p<0.001 vs. ceruleína. Número de casos: 4-6.

En condiciones fisiológicas uno de los principales secuestradores de NF-κB en citoplasma es IκB-α, miembro de la familia de inhibidores IκB. El modelo de pancreatitis aguda por ceruleína induce la degradación de IκB-α, liberando la subunidad activa de NF-κB que se transloca al núcleo a fin de inducir la expresión de mediadores pro-inflamatorios (*Gukovsky y col.*,

1998). Con el propósito de confirmar el grado de activación de NF- κ B, se evaluó de manera indirecta la degradación de I κ B- α .

Los resultados mostraron que la expresión de I κ B- α disminuyó en los animales con pancreatitis aguda lo que se relaciona con el mayor grado de activación de NF- κ B (Figura 17). En el mismo sentido, los animales tratados con secretina o ANF mostraron un incremento de la expresión de I κ B- α respecto a estos grupos, siendo su expresión similar al grupo control. Estos resultados permiten confirmar el grado de activación de NF- κ B observado en los distintos grupos experimentales.

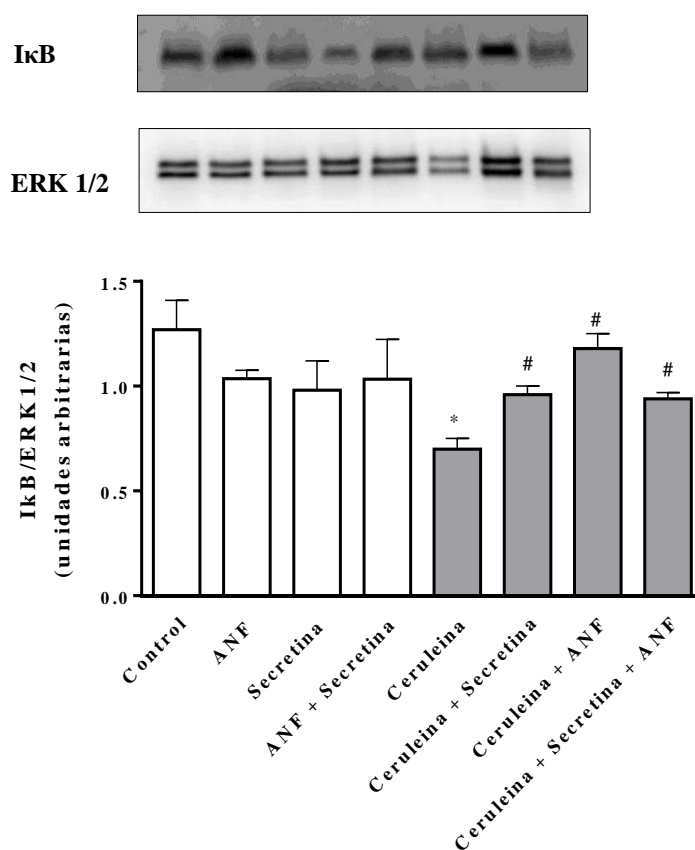


Figura 17: Expresión de I κ B en páncreas. La expresión de I κ B se realizó por Western Blot según se detalla en Materiales y Métodos. Panel superior: Western Blot representativo de la expresión de I κ B (35 kDa) y ERK1/2 (42-44 kDa). Panel inferior: Análisis densitométrico expresado en unidades arbitrarias de la relación I κ B/ERK 1/2. *: $p < 0.05$ vs. control; #: $p < 0.05$ vs. ceruleina. Número de casos: 4-6.

1.2- El ANF disminuye los niveles intrapancreáticos de TNF- α

El TNF- α juega un papel preponderante en el mantenimiento y amplificación de la respuesta inflamatoria en la pancreatitis aguda (Gukovsky y col., 1998). El aumento en la expresión de esta citoquina pro-inflamatoria es inducido por el factor de transcripción NF- κ B.

En virtud a que el ANF disminuyó la translocación al núcleo de NF- κ B, existía la posibilidad de que también redujera lo niveles de TNF- α , por lo que se determinaron sus niveles intrapancreaticos por ELISA.

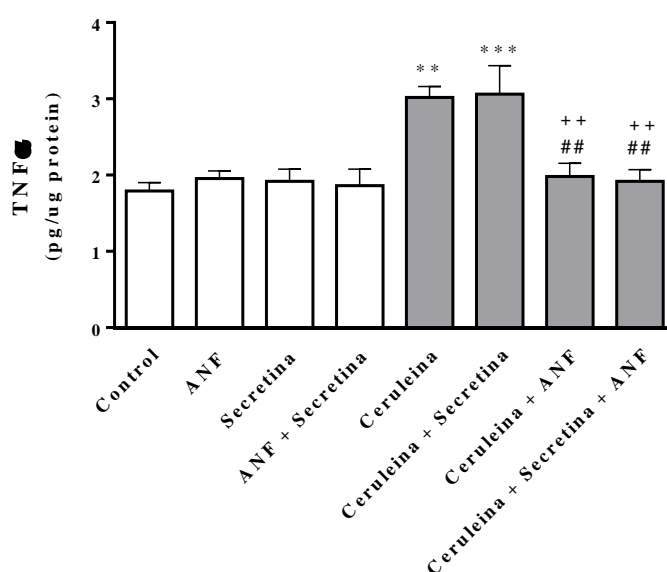


Figura 18: Niveles intrapancreáticos de TNF- α (pg/ μ g de proteína). Los niveles de TNF- α se determinaron por enzimo-inmuno ensayo (ELISA) como se detalla en Materiales y Métodos. **: p<0.01 y ***: p< 0.001 vs. Control; ##: p<0.01 vs. Ceruleina; ++: p<0.01 vs. Ceruleina + secretina. Número de casos: 5-7.

Los resultados mostraron que la administración de ANF, secretina o ambos péptidos no modificaron los niveles intrapancreáticos de TNF- α (Figura 18). En los animales tratados con ceruleina TNF- α se incrementó significativamente en páncreas acorde a lo descrito en la bibliografía (Bhatia y col., 2000). Los animales infundidos asimismo con secretina presentaron también niveles elevados de la citoquina, si bien no fueron estadísticamente diferentes de los tratados sólo con ceruleina. Sin embargo, cuando estos dos grupos de animales se trataron con ANF el contenido intrapancreático de TNF- α disminuyó significativamente, observándose valores

similares a los animales controles. La disminución de los niveles de TNF- α inducido por ANF sería consecuencia de la reducción de la activación de NF- κ B. No obstante, los resultados en presencia de secretina muestran que otros factores, además de NF- κ B, contribuyen a elevar los valores de TNF- α .

Se midieron asimismo los niveles TNF- α en plasma, ya que su aumento implica compromiso sistémico. Si bien el modelo animal de pancreatitis aguda empleado en este estudio no presenta compromiso sistémico, cabía la posibilidad de que en los animales tratados asimismo con secretina mostraran modificaciones de los niveles plasmáticos de esta citoquina (*Lerch y Gorelick, 2013*). No obstante, no se observaron variaciones plasmáticas de TNF- α en ninguno de los grupos estudiados (Datos no mostrados).

1.3- El ANF reduce la activación de ERK 1/2

La activación de las MAPKs constituye asimismo uno de los eventos tempranos reportado en la pancreatitis aguda. Se ha demostrado que tanto *in vitro* como *in vivo* la ceruleína estimula la fosforilación de ERK1/2 (*Duan y Williams, 1994*). Asimismo, ERK 1/2 participa indirectamente en la síntesis de los principales mediadores inflamatorios al inducir activación de NF- κ B (*Irrera y col., 2014*). La activación de la ERK 1/2 se evaluó a través de su grado de fosforilación que constituye un pre-requisito para su activación.

Acorde a lo descrito en bibliografía, el tratamiento con ceruleína estimuló la activación de ERK 1/2, siendo su activación similar en presencia de secretina (*Figura 19*). El ANF redujo significativamente el grado de activación de ERK 1/2 en presencia y en ausencia de secretina. Sin embargo, esta reducción fue mayor en ausencia de la hormona, alcanzando valores similares al grupo control. Estos hallazgos muestran que la inhibición de la activación de ERK 1/2 por el ANF en la pancreatitis aguda es independiente de su efecto sobre la señalización de la secretina.

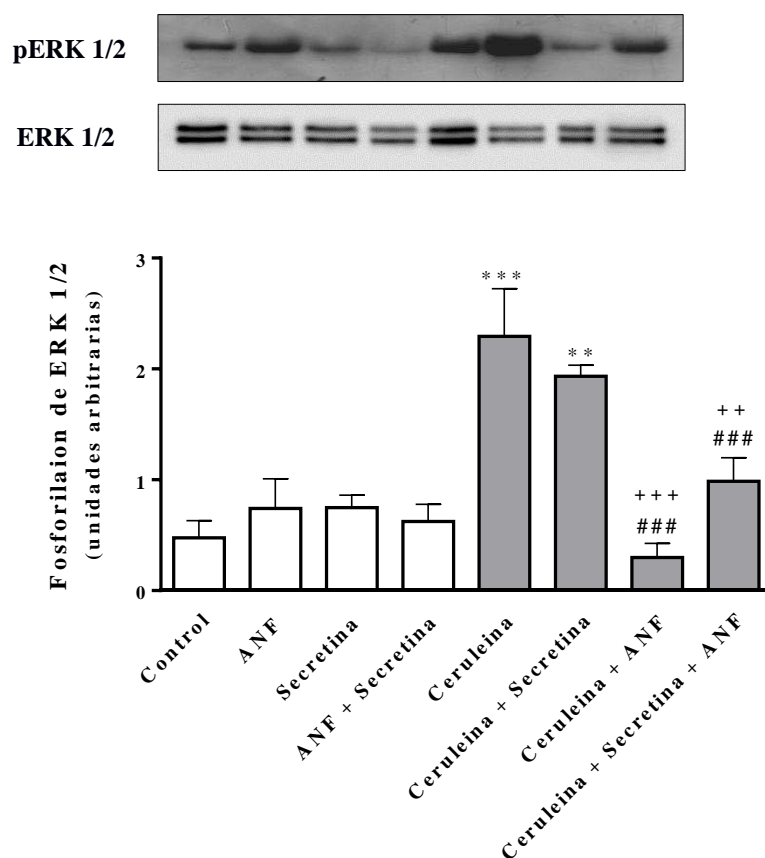


Figura 19: Estado de fosforilación de ERK 1/2 en páncreas. La expresión de ERK 1/2 y su grado de fosforilación se determinó por Western Blot en páncreas como se detalla en Materiales y Métodos. Panel superior: Western Blots representativos de la expresión de fosfo-ERK 1/2 (pERK 1/2) (45 kDa) y ERK 1/2 total. Panel inferior: Análisis densitométrico expresado en unidades arbitrarias de la relación fosfo-ERK 1/2/ERK 1/2 total para cada condición experimental. **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$ vs. control; ###: $p < 0.001$ vs. ceruleína; ++: $p < 0.01$ y +++: $p < 0.001$ vs. ceruleína + secretina. Número de casos: 4-6.

1.4- El ANF disminuye la expresión de la enzima COX-2

La enzima COX-2 es de expresión inducible y juega un papel importante en la pancreatitis aguda a partir de la síntesis de prostaglandinas, en particular PGE_2 , que amplifica y propaga la respuesta inflamatoria. La inhibición de COX-2 mejora significativamente la pancreatitis aguda al atenuar la respuesta inflamatoria (Song y col., 2002; Foitzik y col., 2003). Por otra parte, se demostró que el ANF tiene la capacidad de inhibir la síntesis y la expresión de COX-2 en cultivos de macrófagos (Kierner y col., 2002). Por lo expuesto se evaluó la expresión de la enzima COX-2

por Western Blot en los distintos grupos experimentales. Los resultados mostraron que en los animales tratados con ceruleína aumentó significativamente la expresión de la enzima COX-2 (Figura 20) como indica la bibliografía (Van Ooijen y col., 1988; Vollmar y col., 1989; Ethridge y col., 2002; Slogoff y col., 2004). En presencia de la secretina la expresión de la enzima disminuyó significativamente, si bien cuando los animales se trataron con ANF la reducción en la expresión de la enzima COX-2 fue aún mayor, observándose aparentemente un efecto aditivo con la secretina. Estos resultados muestran que tanto el ANF como la secretina reducen la expresión de la enzima COX-2 en la pancreatitis aguda.

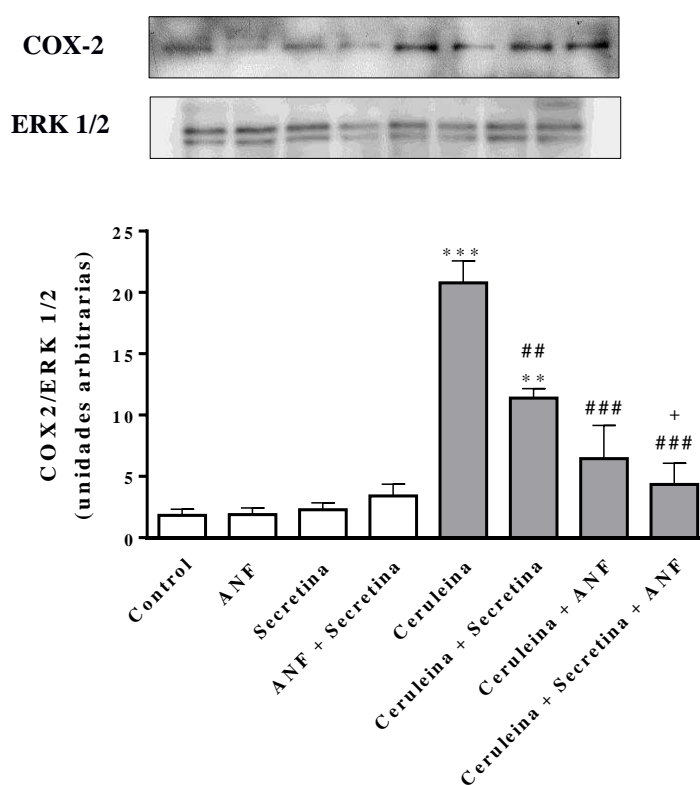


Figura 20: Expresión de COX2 en páncreas. La expresión de COX2 se determinó en páncreas por Western Blot como se detalla en Materiales y Métodos. Panel superior: Western Blots representativos de la expresión de COX2 (69 kDa) y ERK 1/2 total. Panel inferior: Análisis densitométrico expresado en unidades arbitrarias de la relación COX2 /ERK 1/2 total para cada condición experimental. **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$ vs. control; ##: $p < 0.01$ y ###: $p < 0.001$ vs. ceruleína; +: $p < 0.05$ vs. ceruleína + secretina. Número de casos: 4-5.

1.5- EL ANF reduce los niveles intrapancreáticos de PGE₂

En la pancreatitis aguda la PGE₂ es la principal prostaglandina producto de la activación de COX-2, que una vez sintetizada sale al espacio extracelular y actúa de manera autocrina y/o paracrina amplificando la respuesta inflamatoria. Se determinaron los niveles intrapancreáticos de PGE₂ por RIA en los distintos grupos experimentales.

Los resultados mostraron que ni el ANF ni la secretina *per se* modificaron los niveles de PGE₂, pero la administración de ceruleína provocó un aumento significativo de la prostaglandina acorde a lo descrito en la literatura (Figura 21) (Van Ooijen y col., 1988). Los animales infundidos con secretina mostraron niveles intrapancreáticos de PGE₂ menores que los animales con pancreatitis aguda, al igual que el ANF, si bien su efecto fue mayor que el de secretina. Estos hallazgos guardan relación con la expresión de COX-2.

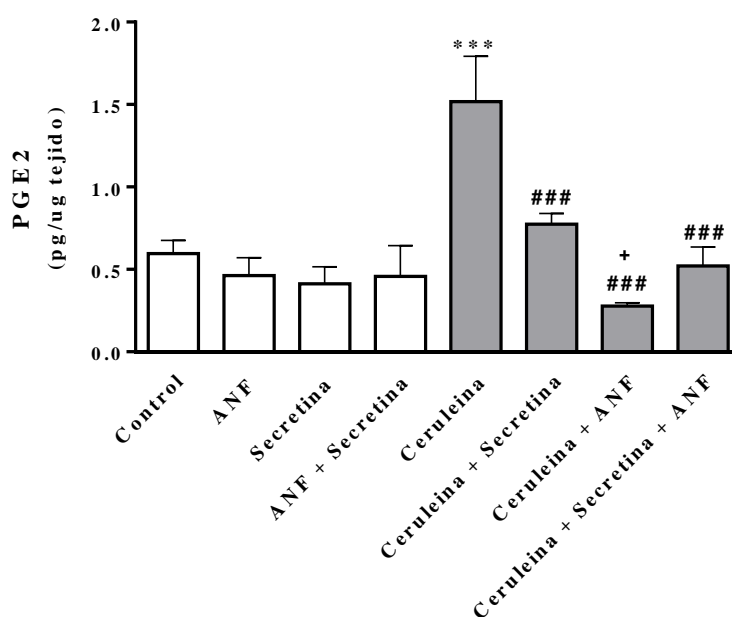


Figura 21: Niveles intrapancreáticos de PGE₂. Los niveles intrapancreáticos de PGE₂ se determinaron en páncreas por radioinmunoensayo (RIA) como se detalla en Materiales y Métodos. ***: p<0.001 vs. control; ###: p<0.001 vs. ceruleina; +: p<0.05 vs. ceruleina + secretina. Número de casos: 4-6.

1.6- El ANF disminuye la expresión de la enzima iNOS

La enzima iNOS, al igual que COX-2, es también de expresión inducible y su actividad se estimula significativamente en procesos inflamatorios llevando a una elevada producción de NO que contribuye significativamente a amplificar la inflamación y extender el daño celular.

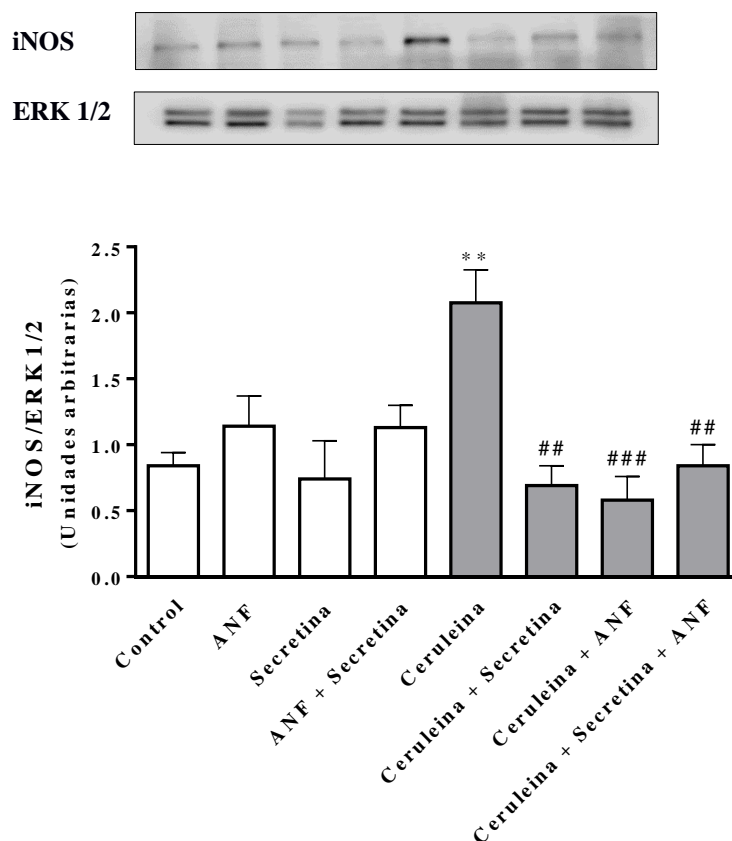


Figura 22: Expresión de iNOS en páncreas. La expresión de iNOS se determinó en páncreas por Western Blot como se detalla en Materiales y Métodos. Panel superior: Western Blots representativos de la expresión de iNOS (130 kDa) y ERK 1/2 total. Panel inferior: Análisis densitométrico expresado en unidades arbitrarias de la relación iNOS /ERK 1/2 total para cada condición experimental. **: $p < 0.01$ vs. control; #: $p < 0.01$ y ###: $p < 0.001$ vs. ceruleína. Número de casos: 4-5.

Los resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de la enzima en presencia ceruleína, conforme a lo descrito en bibliografía (Ang y col., 2009) (Figura 22). Tanto la secretina como el ANF disminuyeron significativamente la expresión de la enzima, mostrando valores semejantes a los grupos control. Estos resultados muestran que ambos péptidos inhiben el aumento de la expresión de la iNOS en la pancreatitis aguda.

1.7- El ANF modula la expresión del factor de transcripción PPAR γ

Se evaluó la expresión de PPAR γ ya que se demostró que este factor de transcripción es un regulador negativo de procesos inflamatorios. Su activación reduce la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos y disminuye la síntesis de PGE₂ a través la inhibición de la actividad de COX-2 (Jiang y col., 1998; Ricote y col., 1998). Asimismo, se ha demostrado que ligandos que estimulan PPAR γ tienen efectos protectores en la pancreatitis aguda, ya que inhiben la respuesta inflamatoria y estimulan la muerte por apoptosis (Gao y col., 2015; Xu y col., 2013).

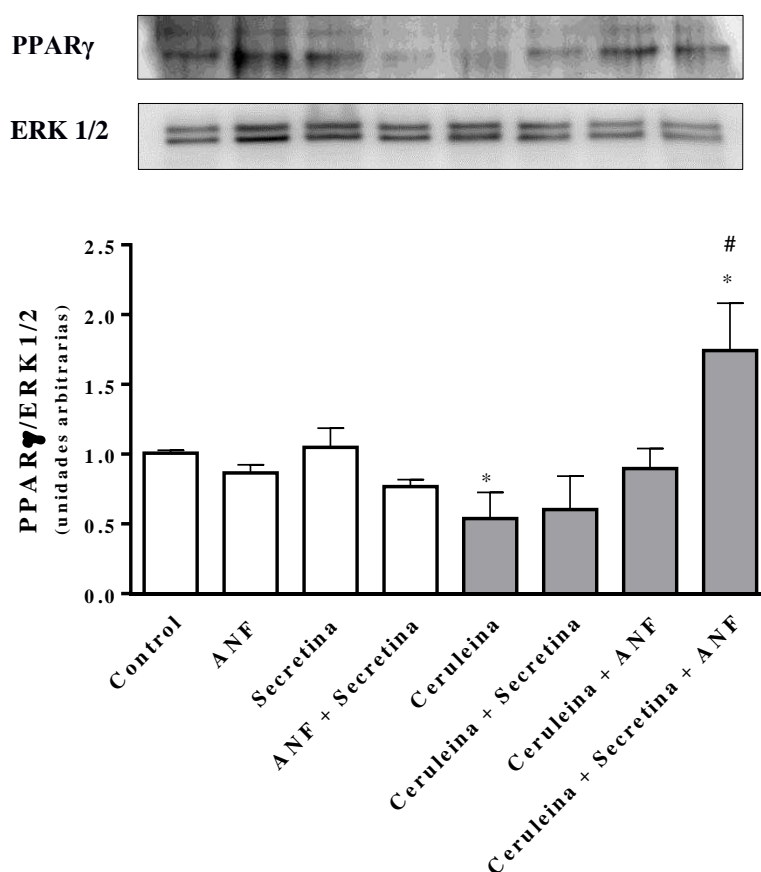


Figura 23: Expresión del factor de transcripción PPAR γ en páncreas. La expresión de PPAR γ se determinó en páncreas por Western Blot como se detalla en Materiales y Métodos. Panel superior: Western Blots representativos de la expresión de PPAR γ (58 kDa) y ERK 1/2 total. Panel inferior: Análisis densitométrico expresado en unidades arbitrarias de la relación PPAR γ /ERK 1/2 total para cada condición experimental. *: $p < 0.05$ vs. control; #: $p < 0.05$ vs. ceruleina. Número de casos: 3-4.

Los resultados mostraron que en los animales tratados solo con ANF, secretina o ambos péptidos no se modificó la expresión de PPAR γ , si bien en los animales con pancreatitis aguda la expresión del factor de transcripción fue menor acorde a lo reportado en la literatura (*Figura 23*). Los animales tratados asimismo con ANF mostraron una tendencia a incrementar la expresión de PPAR γ , pero la misma no resultó estadísticamente significativa. No obstante, en presencia de secretina y ANF los animales con pancreatitis aguda mostraron una expresión incrementada de PPAR γ .

1.8- El ANF disminuye la activación de la enzima MPO

En la pancreatitis aguda, como en todos los procesos inflamatorios agudos, se produce la liberación de mediadores que promueven el aumento de la permeabilidad vascular y la expresión de moléculas de adhesión favoreciendo la infiltración leucocitaria, a predominio de neutrófilos (*Kimura y col., 2003*). Este tipo celular amplifica la respuesta inflamatoria principalmente a partir de la producción y liberación de radicales libres del oxígeno que favorecen la necrosis celular (*Malleo y col., 2007*).

En virtud a que los resultados precedentes mostraron que el ANF disminuyó o inhibió distintos parámetros de la respuesta inflamatoria se evaluó indirectamente la infiltración de neutrófilos en páncreas a través de la determinación de la actividad de MPO en los distintos grupos experimentales.

Acorde a lo reportado en la literatura, en los animales con pancreatitis aguda la actividad de la enzima se incrementó significativamente (*Figura 24*). Sin embargo, en presencia de ANF la actividad de MPO mostró valores similares a los animales controles. Un hallazgo sorprendente fue que los animales tratados con ceruleina y secretina que presentan un cuadro más grave de la patología, presentaron valores de actividad de MPO disminuidos respecto a los animales con pancreatitis, lo que podría estar eventualmente relacionado con el mayor grado de necrosis pancreática que presenta este grupo experimental. Por otra parte, también se observó que los

animales tratados sólo con ANF mostraron valores de MPO ligeramente superiores a los animales controles, si bien la razón de este hallazgo es, al presente, desconocida (Figura 24).

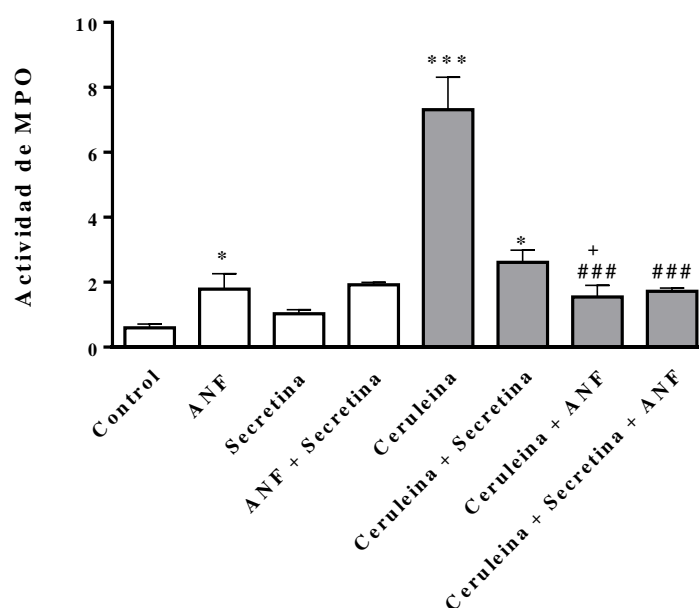


Figura 24: Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en páncreas. La actividad de MPO se determinó por XX como se detalla en Materiales y Métodos. *: $p < 0.05$ y ***: $p < 0.001$ vs. Control; ###: $p < 0.001$ vs. Ceruleina; +: $p < 0.05$ vs. Ceruleina + secretina. Número de casos: 3-5.

Los resultados precedentemente detallados indican que el ANF atenúa la respuesta inflamatoria en la pancreatitis aguda experimental, siendo su efecto en la mayoría de los casos independiente de su regulación de la señalización de secretina. En virtud a estos resultados se efectuaron estudios a fin de determinar si la atenuación de la respuesta inflamatoria se relacionaba con el grado y tipo de muerte celular.

2- EFECTOS DEL ANF SOBRE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS EN LA PANCREATITIS AGUDA

En la pancreatitis aguda las células acinares mueren por necrosis o apoptosis. El aumento de la apoptosis frente a la necrosis en este contexto conlleva a un mejor pronóstico de la patología al predisponer al páncreas a una menor respuesta inflamatoria (*Bathia, 2004*). El ANF promueve la apoptosis a nivel endotelial (*Suenobu y col., 1999*) pero también se comporta como un factor anti-apoptótico en otros tipos celulares y situaciones fisiopatológicas (*Kato y col., 2005; Aoyama y col., 2009; Dineva y col., 2011; Yamada y col., 2013*). En un estudio reciente mostramos que por microscopía óptica se observa un mayor número de núcleos de aspecto picnótico en animales con pancreatitis aguda tratados con ANF, lo que sugiere que el péptido podría estimular la apoptosis en esta patología (*Ventimiglia y col., 2015*).

A fin de evaluar el papel del ANF en la apoptosis en los estadios tempranos de la pancreatitis aguda, se cuantificó la cantidad de núcleos apoptóticos por la técnica de TUNEL, así como también la expresión y activación de las enzimas caspasas en los distintos grupos experimentales.

2.1- El ANF aumenta la presencia de núcleos apoptóticos en la pancreatitis aguda

Las células acinares pancreáticas de los animales controles mostraron una morfología normal con núcleos conservados de localización basolateral. Se observó escasa presencia de núcleos apoptóticos (2,87 núcleos apoptóticos cada 1.000 células acinares). Los animales tratados solo con ANF mostraron un incremento significativo de núcleos apoptóticos en relación a los animales controles, siendo conservada la morfología de los acinos (*Figuras 24 y 27*).

En los animales estimulados con secretina, la presencia de núcleos apoptóticos fue mayor que la observada en animales controles, pero menor que en los animales tratados con ANF (*Figura*

25 y 27). Sin embargo, cuando se administraron ambos péptidos no se observó un efecto aditivo en relación al número de núcleos apoptóticos observados. (Figuras 25 y 27).

En los animales con pancreatitis aguda se confirmaron los hallazgos característicos de la patología previamente reportados como vacuolización, áreas necróticas y edema. El número de núcleos apoptóticos fue mayor que en animales controles, pero menor que los tratados sólo con ANF (Figuras 26 y 27). El grupo que además de ceruleína se infundió con secretina presentó un número similar de núcleos apoptóticos cada 1.000 células acinares.

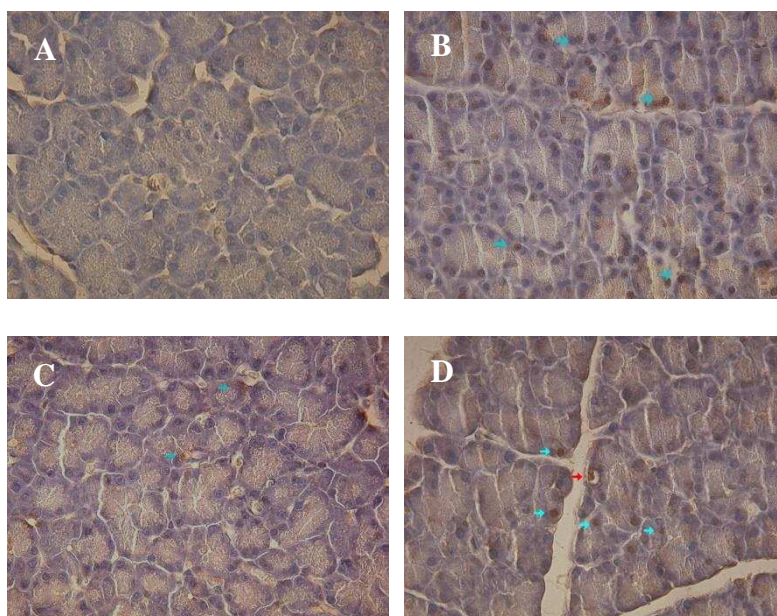
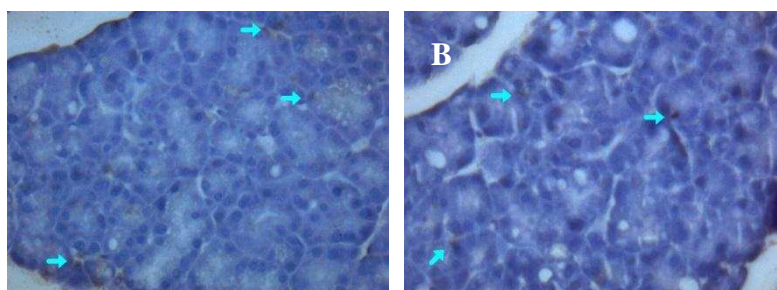


Figura 25: Determinación de núcleos apoptóticos en cortes de tejido de páncreas. Los núcleos apoptóticos se cuantificaron por la técnica de TUNEL según se detalla en Materiales y Métodos. Se muestran imágenes representativas de los grupos experimentales Control (A), ANF (B), Secretina (C) y Secretina y ANF (D). Las flechas celestes indican ejemplos de núcleos apoptóticos mientras que las flechas rojas señalan vacuolas TUNEL positivas.



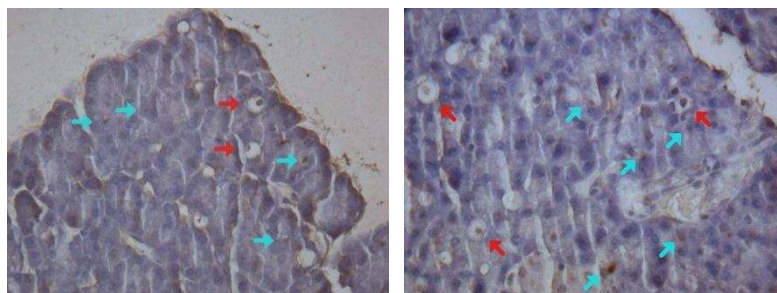


Figura 26: Núcleos apoptóticos en cortes de tejido pancreáticos de animales con pancreatitis aguda. Los núcleos apoptóticos se determinaron por la técnica de TUNEL según se detalla en Materiales y Métodos. Se muestran imágenes representativas de los grupos experimentales: Ceruleína (A), ceruleína + ANF (B), ceruleína + secretina (C) y ceruleína + secretina + ANF (D). Las flechas celestes indican ejemplos de núcleos apoptóticos mientras que las flechas rojas señalan vacuolas TUNEL positivas.

No obstante, en presencia de ANF el número de núcleos apoptóticos se incrementó significativamente respecto a los animales tratados sólo con ceruleína o con ceruleína y secretina (Figuras 26 y 27).

Por otro lado, todos los grupos tratados con ceruleína presentaron vacuolas con marca TUNEL positivo. En el caso de los grupos que además recibieron el tratamiento con ANF la presencia de vacuolas TUNEL positivo fue mayor, coincidentemente con lo observado en la cantidad de núcleos apoptóticos.

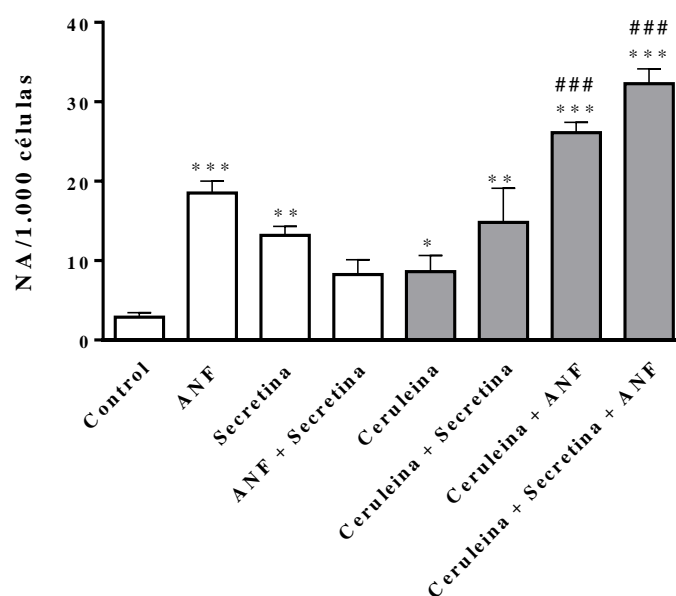


Figura 27: Cuantificación de núcleos apoptóticos (NA) en cortes de tejido páncreas. Los núcleos apoptóticos se cuantificaron por la técnica de TUNEL según se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como número de núcleos apoptóticos cada mil células acinares. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$ vs.

control; ###: $p < 0.001$ vs. ceruleína. La cuantificación se realizó en al menos tres cortes diferentes de cada grupo experimental.

Los resultados previamente detallados muestran que en todos los grupos tratados con ANF el número de núcleos apoptóticos fue mayor y coincidente con los estudios de microscopía óptica previamente realizados en los que en estos grupos presentaron un mayor número de núcleos con aspecto picnótico. En virtud a estos resultados se evaluó la actividad de varias caspasas, enzimas involucradas en la apoptosis.

2.2- El ANF induce la activación de caspasa 3 en la pancreatitis aguda

La caspasa-3 es la caspasa efectora y convergente de ambas vías de la apoptosis. La expresión de la enzima se incrementó en todos los grupos tratados con ANF coincidente con el aumento de núcleos apoptóticos (*Figura 28*). Los animales con pancreatitis aguda mostraron un aumento en la expresión de caspasa-3 compatible con lo reportado para este modelo animal pero que fue aún mayor en presencia de ANF. Si bien los animales tratados con secretina mostraron un aumento en el número de núcleos apoptóticos, este hallazgo no se reflejó en la expresión de caspasa-3.

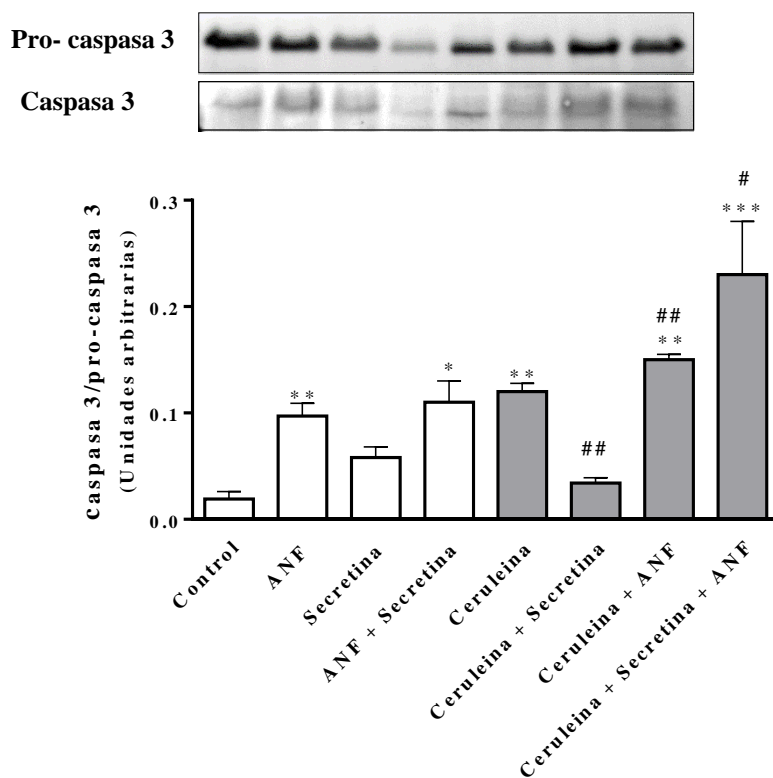


Figura 28: Expresión de caspasa 3 en páncreas. La expresión de pro-caspasa 3 y caspasa 3 se determinó en páncreas por Western Blot como se detalla en Materiales y Métodos. Panel superior: Western Blots representativos de la expresión de pro-caspasa 3 (32 kDa) y caspasa 3 (17 kDa). Panel inferior: Análisis densitométrico expresado en unidades arbitrarias de la relación caspasa 3/pro-caspasa 3 para cada condición experimental. **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$ vs. control; #: $p < 0.05$ y ##: $p < 0.001$ vs. ceruleina. Número de casos: 3-4.

Se determinó asimismo la actividad enzimática de caspasa-3, observándose que la actividad de la enzima se relacionó con su nivel de expresión en los distintos grupos experimentales. El ANF estimuló la actividad de caspasa-3 tanto en animales sanos como con pancreatitis aguda (*Figura 29*).

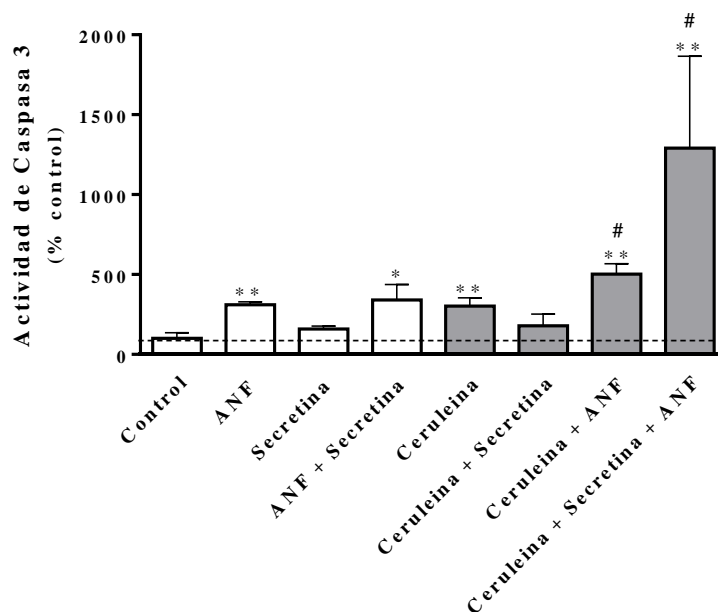


Figura 29: Actividad de caspasa 3. La actividad de la enzima caspasa 3 se determinó por fluorimetría como se detalla en Materiales y Métodos. La línea punteada representa el valor control equivalente a 100%. *: $p < 0.05$ y **: $p < 0.01$ vs. control; #: $p < 0.001$ vs. ceruleina. Número de experimentos: 3-4.

Asimismo, se evaluó la actividad de caspasa-3 en forma indirecta a través del clivaje de la proteína poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), uno de los primeros sustratos identificados de la enzima. PARP es una proteína de 116 kDa que en presencia de caspasa-3 genera un fragmento de 89 kDa (*Lazebnik y col., 1994*). Los resultados mostraron que, si bien la enzima caspasa-3 aumentó su expresión y actividad en los animales sanos tratados con ANF, no se observó modificaciones en el fragmento clivado de PARP. No obstante, en los animales con pancreatitis aguda PARP clivado se incrementó significativamente, siendo este aumento mayor en los animales tratados con ANF (*Figura 30*).

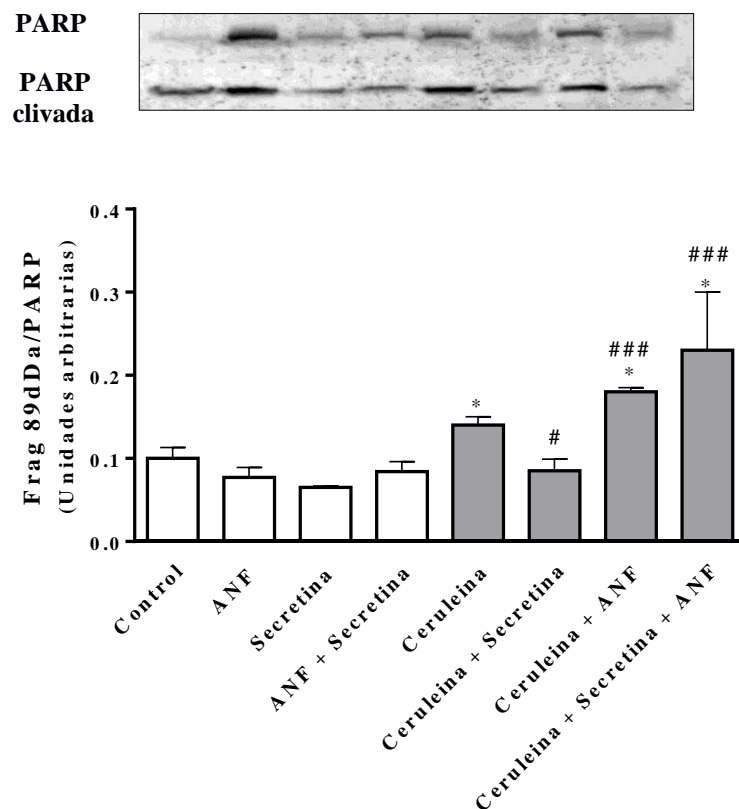


Figura 30: Expresión de PARP en páncreas. La actividad de PARP y su forma clivada de 89 kDa por acción de la enzima caspasa 3 se determinaron por Western Blot según se detalla en Materiales y Métodos. Panel superior: Western Blots representativos de la expresión de PARP y PARP clivado. Panel inferior: Análisis densitométrico expresado en unidades arbitrarias de la relación caspasa 3/pro-caspasa 3 para cada condición experimental. **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$ vs. control; #: $p < 0.05$ y ##: $p < 0.001$ vs. ceruleina. Número de casos: 3-4.

En su conjunto estos resultados sustentan que el ANF estimula la apoptosis en la pancreatitis aguda.

2.3- El ANF y la actividad de la caspasas 8, 9 y 2 en la pancreatitis aguda

Se determinaron asimismo las actividades de las caspasas-2, 8 y 9 en los distintos grupos experimentales. La caspasa-8 es la iniciadora de la vía extrínseca de la apoptosis que se estimula por la unión de ligandos a los receptores de muerte, como Apo-1/Fas, en la membrana plasmática, que lleva a la activación de caspasa-3. La actividad de caspasa-8 no se modificó en los animales sanos, si bien se observó una tendencia al aumento en los animales tratados con ANF, la misma

no fue estadísticamente significativa (*Figura 31*). Por el contrario, en los animales con pancreatitis aguda la actividad de la enzima se incrementó, siendo su aumento aún mayor en los que fueron tratados con ambos péptidos, ANF y secretina.

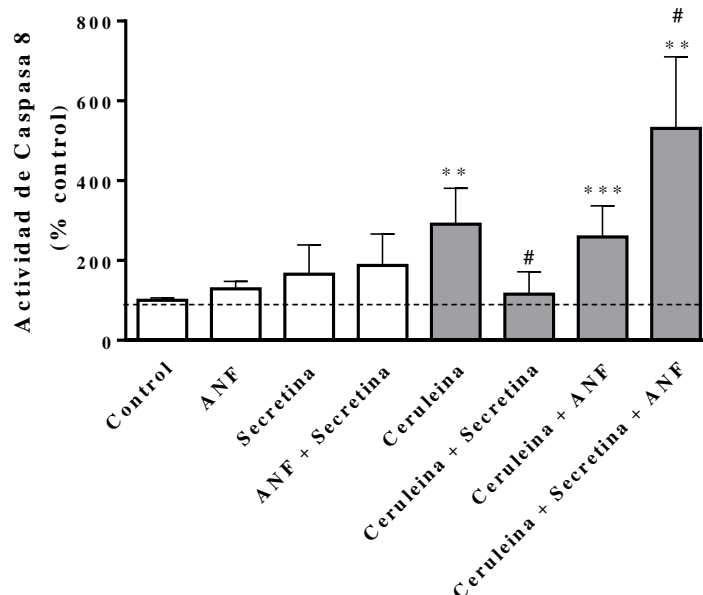


Figura 31: Actividad de caspasa-8. La actividad de la enzima caspasa-8 se determinó por fluorimetría como se detalla en Materiales y Métodos. La línea punteada representa el valor control equivalente a 100%. **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$ vs. control; #: $p < 0.001$ vs. ceruleina. Número de experimentos: 3-4.

La caspasa-9 activa la vía intrínseca y se estimula por señales externas o internas, como daño en el ADN. Las señales que activan esta vía regulan la relación citoplasmática de las proteínas de la familia de Bcl-2. La actividad de caspasa-9 se incrementó significativamente en todos los grupos experimentales con pancreatitis aguda, no observándose diferencias significativas en aquellos que fueron tratados con ANF (*Figura 32*). Asimismo, los animales sanos que recibieron conjuntamente ANF y secretina también mostraron un aumento en la actividad de caspasa-9. Estos resultados confirman que la vía intrínseca de la apoptosis se activa en la pancreatitis aguda pero el ANF no modificaría la actividad de la enzima iniciadora de la vía.

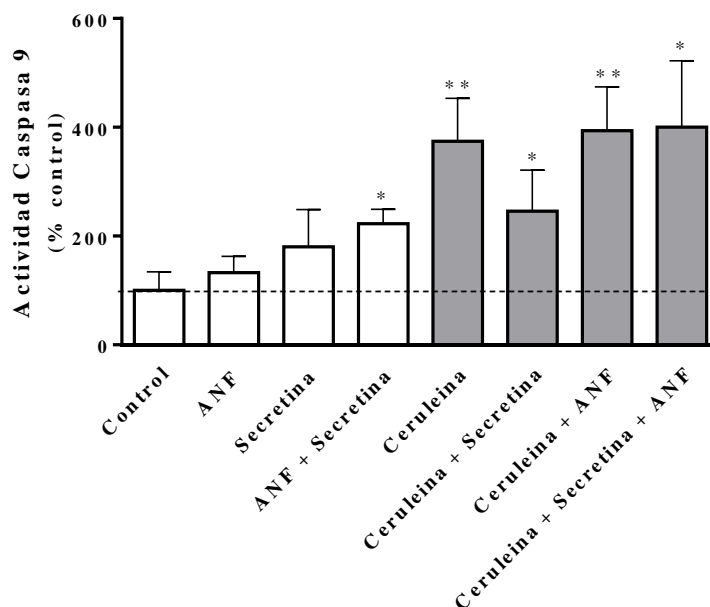


Figura 32: Actividad de caspasa-9. La actividad de la enzima caspasa 9 se determinó por fluorimetría como se detalla en Materiales y Métodos. La línea punteada representa el valor control equivalente a 100%. **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$ vs. control; #: $p < 0.001$ vs. ceruleina. Número de experimentos: 3-4.

Los resultados mostraron que la actividad de caspasa-2 se incrementó en los animales sanos que se trataron con ANF en presencia o ausencia de secretina (Figura 33). Todos los animales con pancreatitis aguda mostraron un aumento en la actividad de la enzima excepto los tratados con secretina. La hormona tampoco modificó caspasa-2 en animales sanos. Si bien se observó una tendencia al aumento en los animales con pancreatitis que recibieron ANF, la misma no resultó estadísticamente significativa.

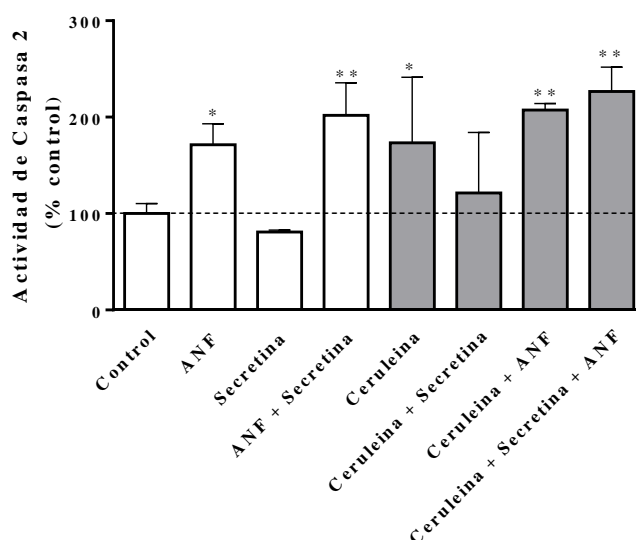


Figura 33: Actividad de caspasa 2. La actividad de la enzima caspasa 2 se determinó por fluorometría como se detalla en Materiales y Métodos. La línea punteada representa el valor control equivalente a 100%. **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$ vs. control; #: $p < 0.001$ vs. ceruleina. Número de experimentos: 3-4.

En virtud a los resultados obtenidos en relación a la participación del ANF en la respuesta inflamatoria y en la apoptosis en la pancreatitis aguda, se evaluó si estos hallazgos guardaban relación con modificaciones en la ultraestructura del páncreas.

3- ANÁLISIS DE LA ULTRAESTRUCTURA DEL PÁNCREAS

Si bien los mecanismos que inician la pancreatitis aguda no se conocen con exactitud es ampliamente aceptado que el sitio de inicio de estos eventos es la célula acinar (Gorelick y Thrower, 2009). Además de observarse edematización y congestión vascular, la pancreatitis aguda se manifiesta histológicamente por importantes cambios a nivel de la célula acinar. Entre estos últimos, se destacan la presencia de vacuolización citoplasmática (representada por micro y macrovacuolas) pérdida de la arquitectura celular (alteración en la localización del núcleo y los

gránulos de zimógeno) y presencia de zonas necróticas (*Rao y col., 1981*). En estudios recientes demostramos que en el modelo animal por administración repetida de ceruleína, la hormona secretina agrava el perfil histopatológico característico de la pancreatitis aguda experimental, observándose por estudios de microscopía óptica una mayor presencia de macrovacuolas (por fusión de microvacuolas), mayor infiltración leucocitaria, necrosis y edematización de la glándula (*Ventimiglia y col., 2015*). Asimismo, observamos que estos cambios se correlacionan con modificaciones de parámetros bioquímicos como aumento de amilasa plasmática y de tripsina intrapancreática. A nivel de la ultraestructura de la célula acinar, se han descrito varias alteraciones, entre ellas la presencia de vacuolas autofágicas, la disminución de la cantidad de gránulos de zimógeno y la dilatación y *swelling* del RER (*Brackett y col., 1983*). Para evaluar si el ANF genera cambios en la ultraestructura celular en la pancreatitis aguda, realizamos un estudio de microscopía electrónica de transmisión (MET).

Los acinos pancreáticos provenientes de animales pertenecientes al grupo control mostraron una ultraestructura conservada acorde a lo reportado en bibliografía (*Sjöstrand y Hanzon, 1954*) (*Figuras 34 y 35*). Los núcleos mostraron una morfología conservada, ya que presenton membrana nuclear intacta y distribución de la cromatina normal. Se observó asimismo abundante cantidad gránulos de zimógeno ubicados principalmente en la región apical de la célula acinar y gran desarrollo del RE en la zona perinuclear compatible con la función de este tipo celular. El sistema vacuolar se encuentra en actividad y tanto las mitocondrias como el lumen acinar presentan aspecto regular al igual que los vasos sanguíneos. Las uniones estrechas se observaron intactas (*Figuras 34-36*)

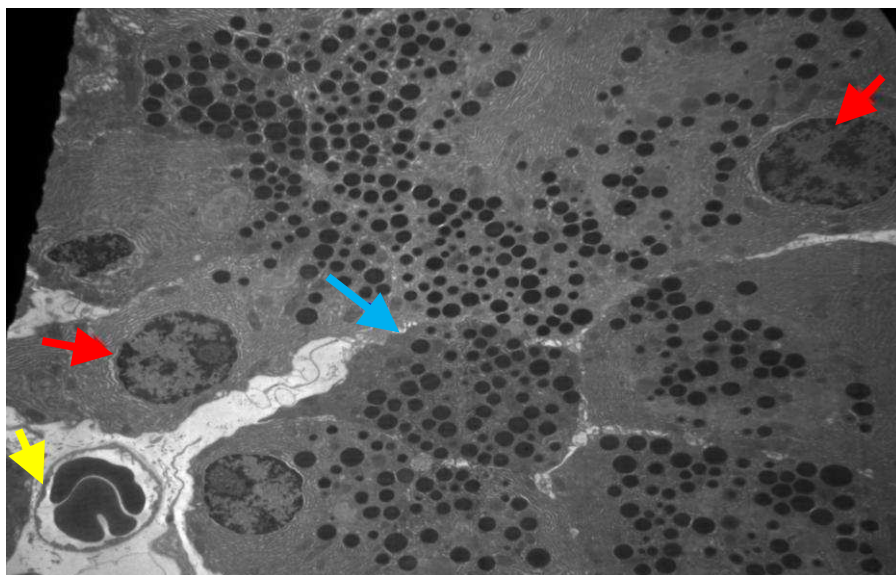


Figura 34: Micrografía electrónica representativa de acinos pancreáticos de un animal control: núcleos (flechas rojas); gránulos de zimógeno (flecha azul); vasos sanguíneos (flecha amarilla); MET (3000X).

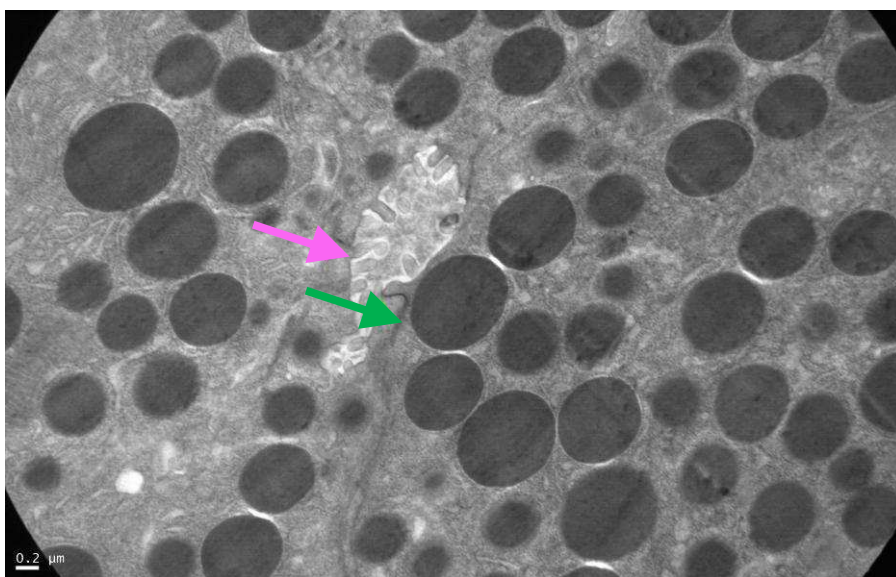


Figura 35: Micrografía electrónica representativa de acinos pancreáticos de un animal control: lumen (flecha rosa); unión estrecha (flecha verde); MET (20000X).

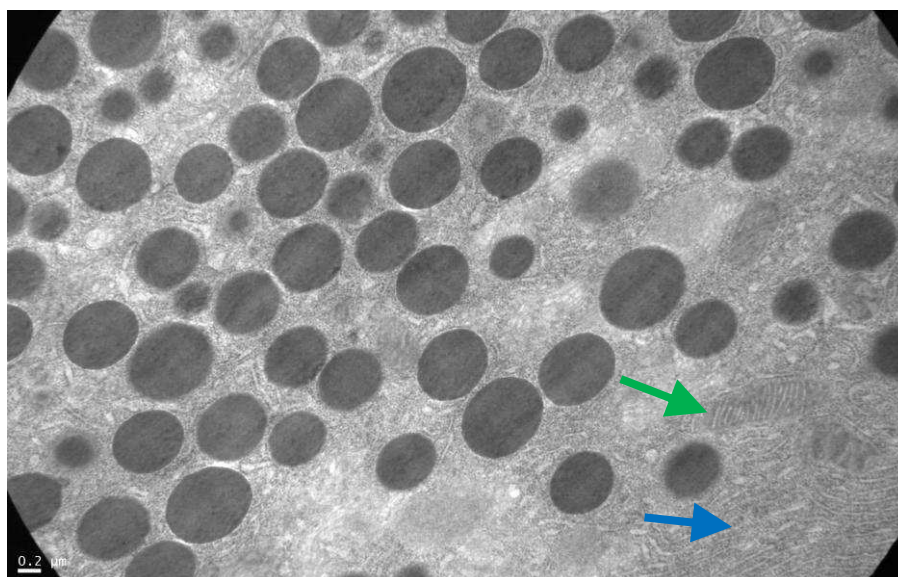


Figura 36: Micrografía electrónica representativa del citoplasma de una célula acinar de un animal control. Se observan mitocondrias (flecha verde) y RE (flecha azul); MET (30000X).

En los animales con pancreatitis aguda por administración de ceruleína, se observó que el páncreas exocrino perdió su topografía característica y evidenció importante desorganización celular. Los gránulos de zimógeno se observaron dispersos en el citoplasma y no localizados en la región apical, siendo su densidad menor. El lumen acinar presentó una morfología diferente y el RE no se localizó en posición perinuclear y en muchos casos presentó *swelling*. Se observaron células muertas y células infiltrantes compatibles con fibroblastos ya que también se evidencian fibras de colágeno lo que sugiere inicio del proceso de reparación celular. Asimismo, se observaron núcleos con interdigitaciones e hiper cromáticos y la presencia de edemas intra e intercelulares. Se observó presencia de procesos mielínicos y de vacuolas que exhiben distinta morfología. Se evidenciaron micro y macrovacuolas así como también fagolisosomas. Las alteraciones morfológicas observadas coinciden con lo reportado en bibliografía (*Brackett y col., 1983*). (*Figuras 37 y 38*).

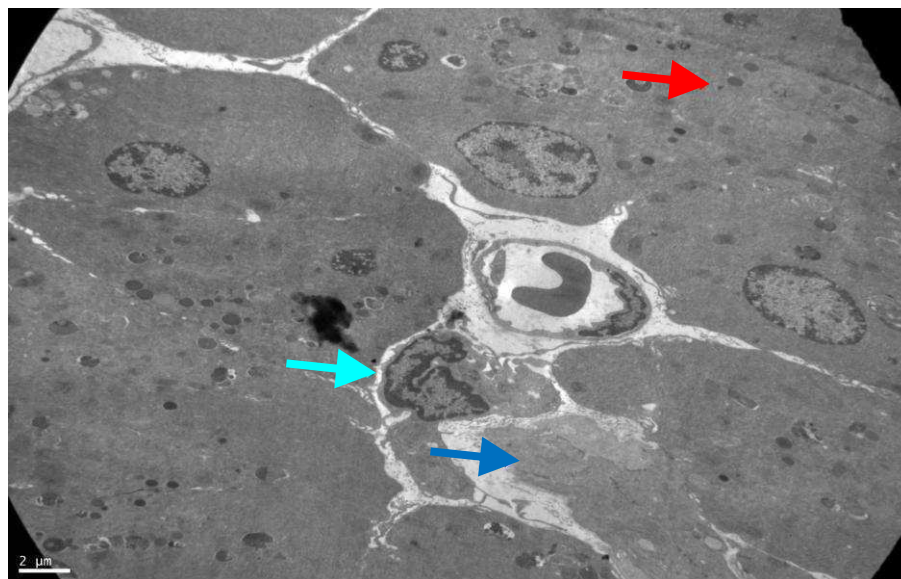


Figura 37: Micrografía electrónica representativa de páncreas de un animal tratado con ceruleína (pancreatitis aguda). Célula muerta (flecha azul); célula infiltrante (flecha turquesa), gránulos de zimógeno dispersos (flecha roja). MET (4400X).

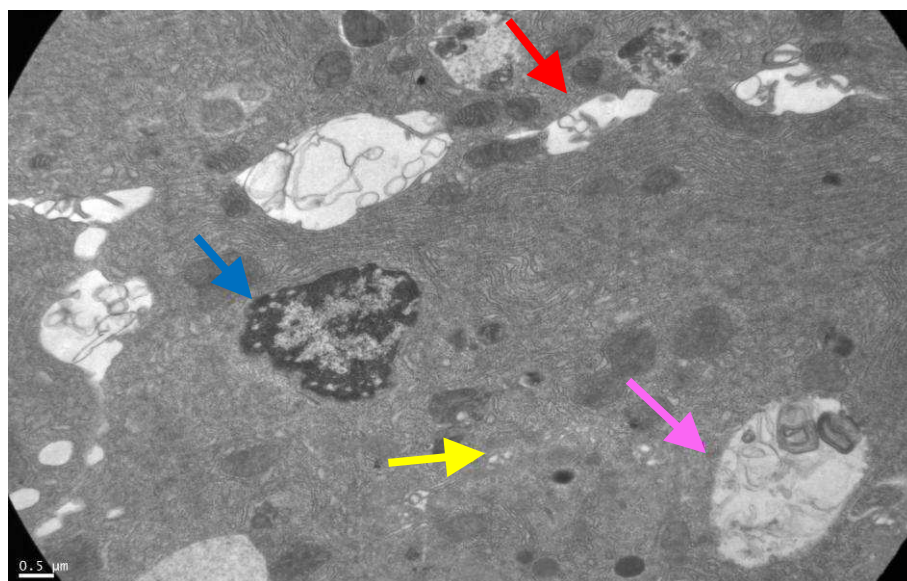


Figura 38: Micrografía electrónica representativa del páncreas de animal tratado con ceruleína: núcleo hiper Cromático (flecha azul); edema interceluar e intarceluar (flechas amarilla y roja, respectivamente); vacuola con doble membrana con contenido intramembranoso (autofagosoma) (flecha rosa); MET (12000X).

El páncreas de los animales tratados con ceruleína y secretina presentó un daño histopatológico mayor en comparación a los animales tratados sólo con ceruleína (*Figuras 39 y 40*). Se perdió completamente la topología celular observándose un gran número de vacuolas dispersas en el citoplasma. Es de destacar que en muchas regiones se observó pérdida notable de

las divisiones celulares y de uniones estrechas. El RER presentó alteraciones morfológicas importantes como dilatación, invaginaciones, *swelling*, vacuolas, y pérdida de sus ribosomas.

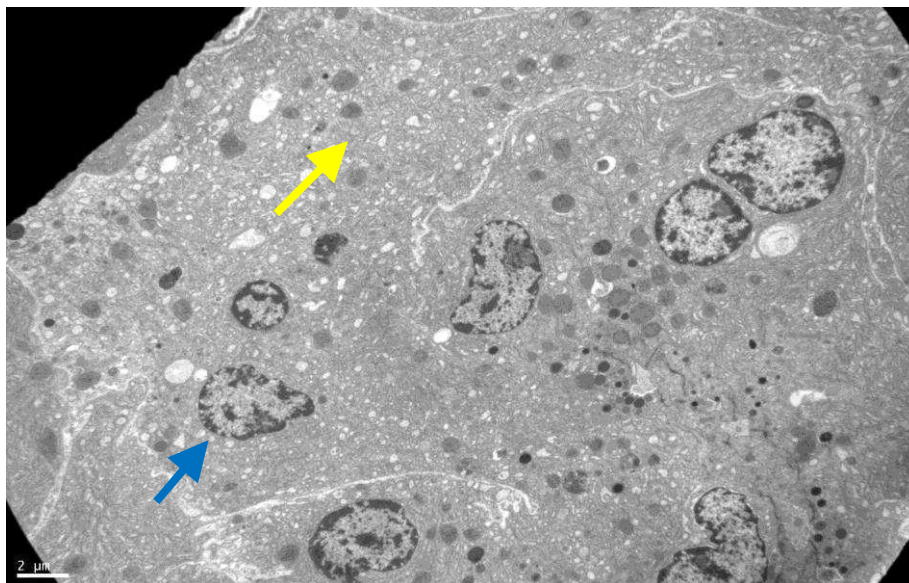


Figura 39: Micrografía electrónica representativa del páncreas de animal tratado con ceruleína y secretina: núcleo con interdigitaciones y tamaño reducido (flecha azul). Pérdida de la topología celular y abundante presencia de vacuolización citoplasmática (flecha amarilla). MET (4400X).

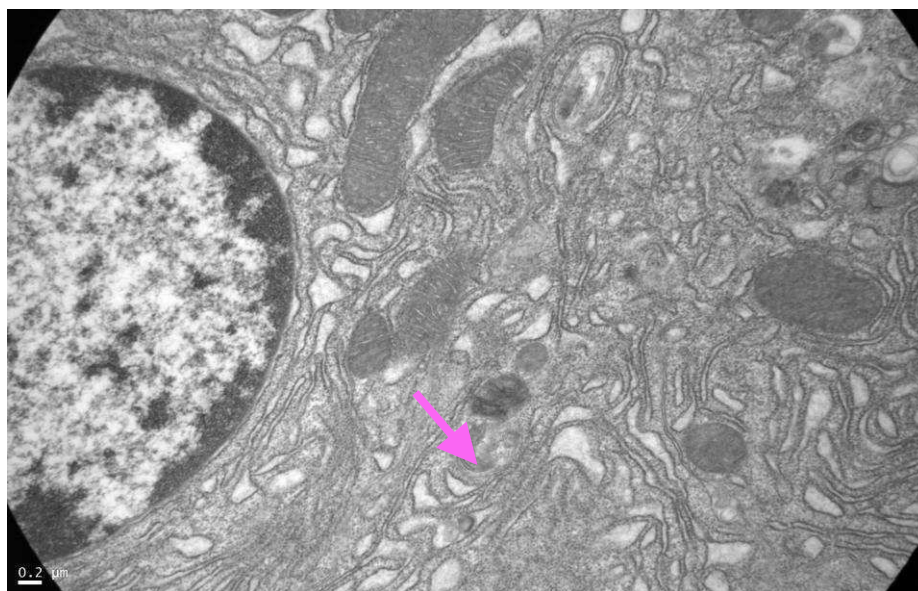


Figura 40: Ultraestructura de páncreas de animal tratado con ceruleína y secretina: *swelling* de RE (flecha rosa). MET (20000X).

Se observaron los núcleos hiper cromáticos, de menor tamaño y con interdigitaciones. Se

evidenció un mayor número de micro y macrovacuolas así como también, amplias zonas de necrosis y daño vascular (*figuras 41 y 42*

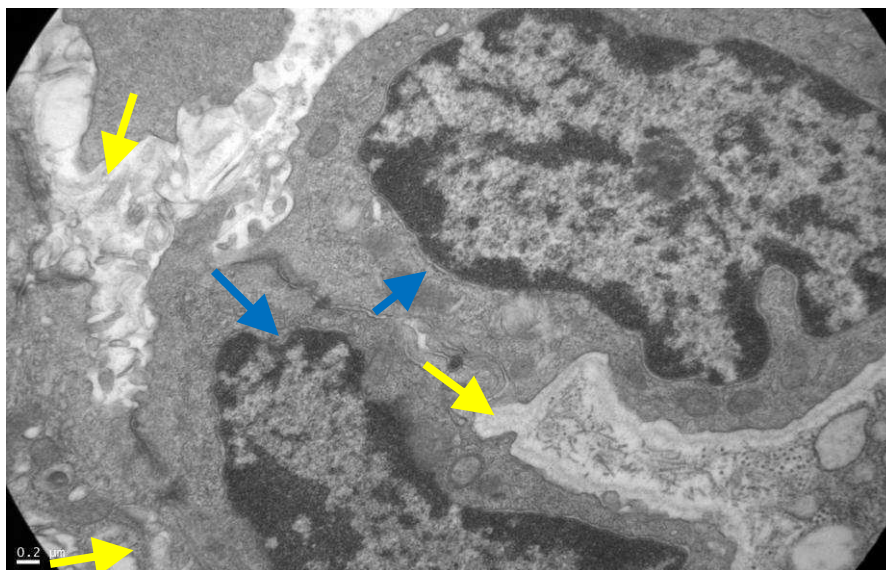


Figura 41: Micrografía electrónica representativa de páncreas de animal tratado con ceruleína y secretina: núcleo con interdigitaciones (flecha azul); edema inter e intracelular (flechas amarillas). MET (20000X).

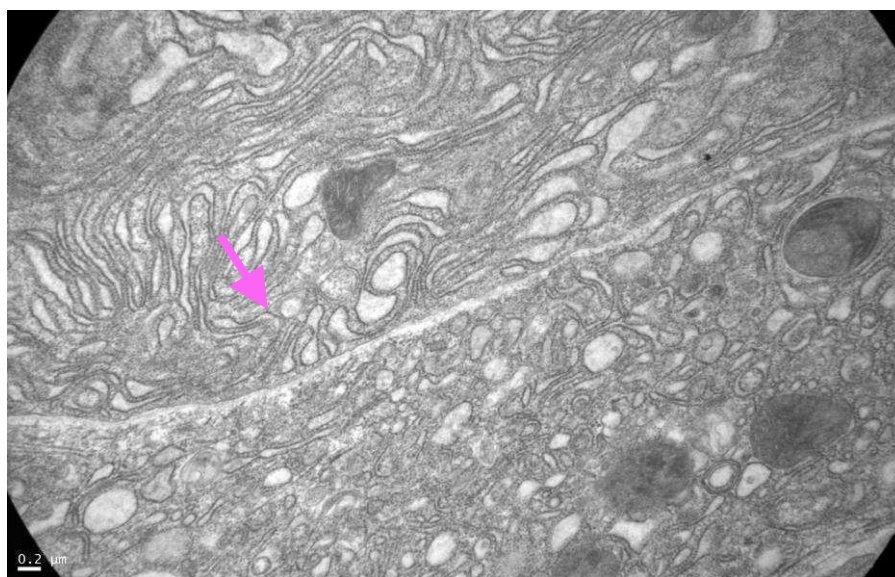


Figura 42: Micrografía electrónica representativa del páncreas de animal tratado con ceruleína y secretina. *Swelling* de RE y ausencia de ribosomas (flecha rosa). MET (20000X).

Los animales tratados con ceruleína y ANF mostraron una arquitectura celular más conservada y menor edematización. Se observó menor número de micro y macrovacuolas así como

también un mayor número de gránulos de zimógeno menos dispersados en el citoplasma y menos áreas necróticas mientras que la vasculatura no mostró alteraciones. Se observó asimismo menor *swelling* del RE y abundantes mitocondrias con morfología conservada. En presencia de ANF la ultraestructura pancreática de los animales con pancreatitis aguda mostó significativa conservación de la morfología celular, lo que refleja las modificaciones en los parámetros inflamatorios inducidas por el péptido. Estos hallazgos sustentan que el ANF atenúa el desarrollo de la patología (*Figuras 43-45*).

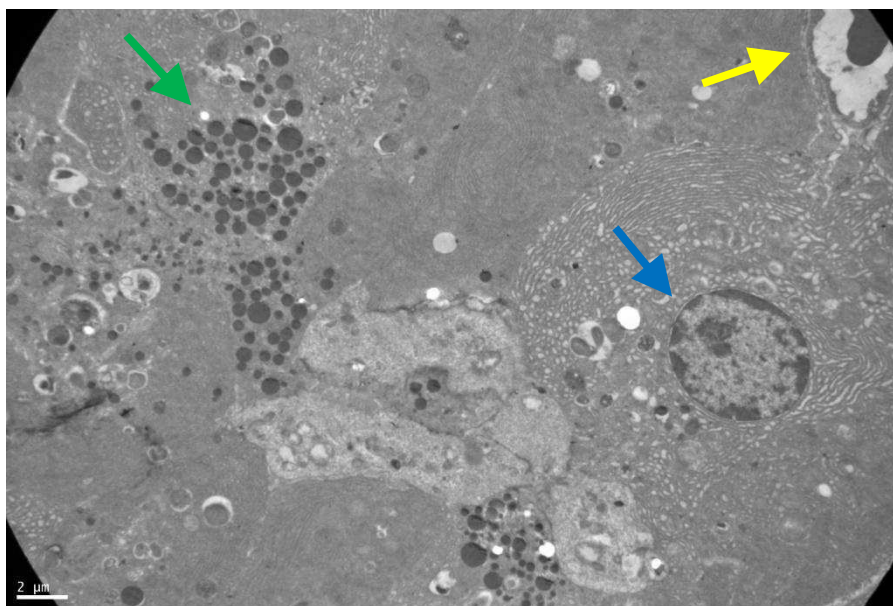


Figura 43: Micrografía electrónica representativa del páncreas de animal tratado con ceruleína y ANF. Gránulos de zimógeno focalizados (flecha verde), núcleo conservado (flecha azul), vaso sanguíneo (flecha amarilla). MET (4400X).

Los páncreas de los animales que recibieron ceruleína, secretina y ANF, exhibieron una morfología acinar más conservada, al igual que el grupo anterior. El lumen acinar, la densidad de los gránulos de zimógeno y las uniones estrechas se muestran conservados. No se observó la pérdida acentuada de los ribosomas del RER. El edema intercelular fue menor ya que se observó separación intersticial, pero sin vacuolas. Se apreció un número mayor de núcleos de morfología conservada y núcleos picnóticos, pero reducción de áreas necróticas. Asimismo, se observaron fibroblastos y fibras de colágeno, indicativo de reparación tisular (*Figuras 46-49*). Las principales

observaciones de la ultraestructura observada en los grupos analizados se resumen en la Tabla III.

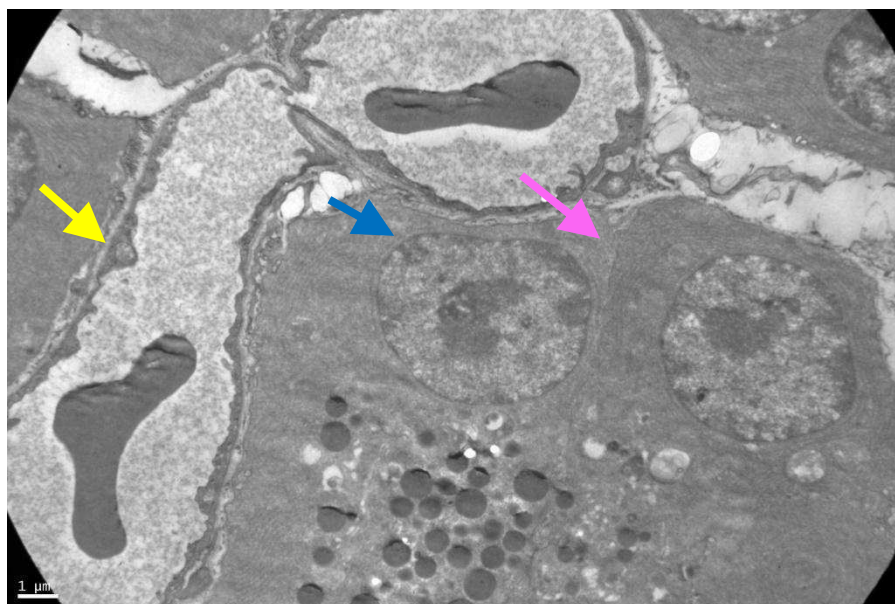


Figura 44: Micrografía electrónica representativa del páncreas de animal tratado con ceruleína y ANF. Se observan las uniones y límites intercelulares conservados (flecha rosa) núcleos y vasos sanguíneos con morfología conservada (flechas azul y amarilla, respectivamente) MET (7000X).

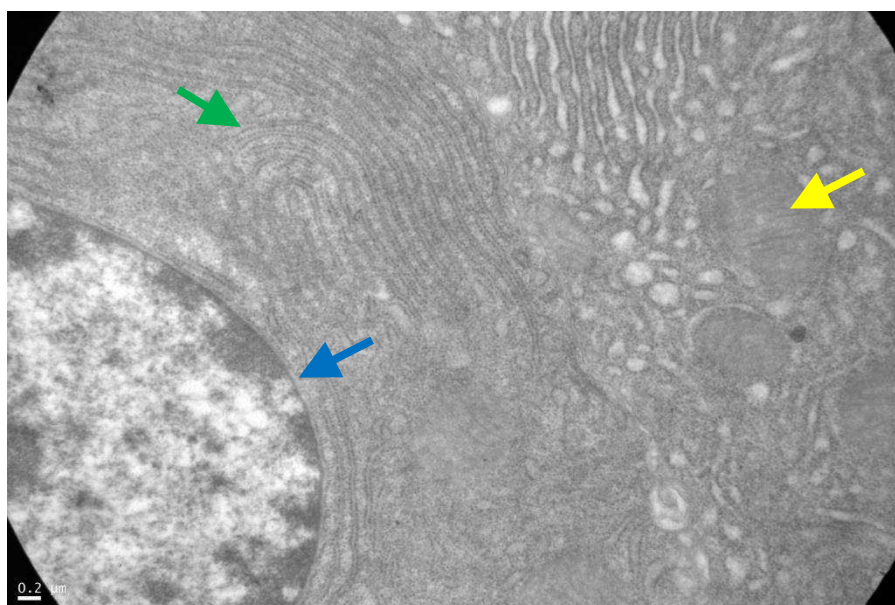


Figura 45: Micrografía electrónica representativa del páncreas de animal tratado con ceruleína y ANF. Se observan zonas con RE (flecha verde), mitocondria (flecha amarilla) y núcleos con morfología normal (flecha azul). MET (20000X).

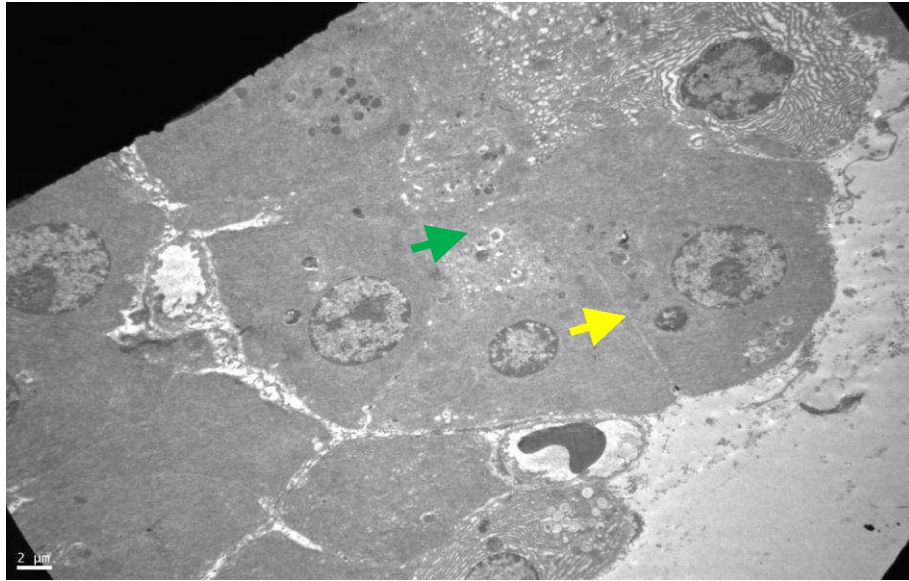


Figura 46: Micrografía electrónica representativa del páncreas de animal tratado con ceruleína, secretina y ANF. Se muestra lumen acinar (flecha verde) y las uniones celulares (flecha amarilla) (MET 3000X).

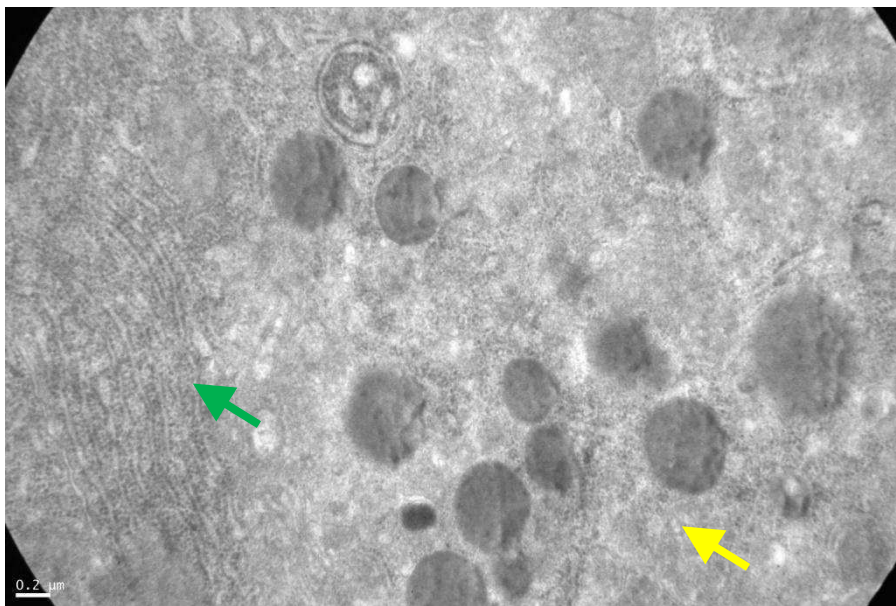


Figura 47: Micrografía electrónica representativa del páncreas de animal tratado con ceruleína, secretina y ANF. Se observa gránulos de zimógeno (flecha amarilla) y reducción del *swelling* del RE (flecha verde) (MET 30000X).



Figura 48: Micrografía electrónica representativa del páncreas de animal tratado con ceruleína, secretina y ANF. Presencia de fibroblasto y colágeno (flecha roja). Se observa estructura del RER con ribosomas (flecha verde) (MET 20000X).

	Control	Ceruleína	Ceruleína + Secretina	Ceruleína + ANF	Ceruleína + Secretina + ANF
Vacuolas	-	+++	+++++	++	+++
Edema inter y/o intracelular	-	++	+++++	++	+++
Pérdida de uniones estrechas/límites intercelulares	-	+++	+++++	++	+++
Swelling de RE	-	++	++++	+	++
Pérdida de ribosomas asociados al RE	-	++	++++	+	++
Swelling mitocondrial	-	++	+++	+	++
Gránulos de zimógeno	+++++	++	++	+++	+++
Cuerpos mielínicos	-	++	+++	+	++

Tabla III: Resumen cualitativo de las principales alteraciones de la ultraestructura pancreática en los distintos grupos experimentales.

Los hallazgos en este trabajo de tesis hasta aquí detallados y los estudios previamente realizados en nuestro laboratorio muestran de manera sólida que el ANF participa de la funcionalidad del páncreas exocrino tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas, lo

que plantea el interrogante de si el ANF es sintetizado en el páncreas, razón por la que esta posibilidad fue explorada.

4- EL PÁNCREAS EXOCRINO COMO FUENTE DE ANF

Si bien el atrio cardíaco constituye la principal fuente de síntesis del ANF, diversos estudios muestran que el péptido también se produce en otros tejidos como el tracto gastrointestinal, hígado y glándulas salivales donde no actuaría como una hormona sino como un factor autacrino y/o paracrino. Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que el ANF regula la funcionalidad del páncreas exocrino de rata, razón por la que llevamos a cabo una serie de estudios a fin de determinar si era fuente de producción de ANF.

4.1- El páncreas exocrino de rata expresa el ARNm de ANF

Se evaluó la presencia del ARNm de ANF en acinos pancreáticos aislados por la técnica de RT-PCR. Utilizamos acinos aislados a fin de excluir el páncreas endocrino representado por los islotes de Langherhans.

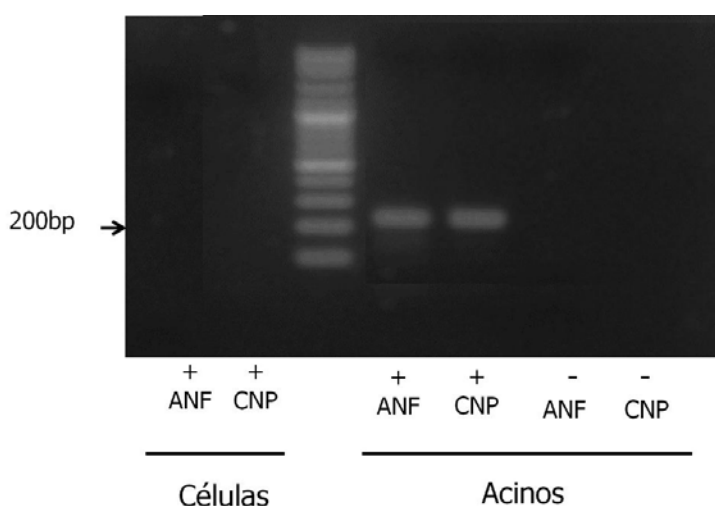


Figura 49: Expresión del ARNm de ANF. La expresión de los péptidos natriuréticos se evaluó en acinos pancreáticos y en la línea celular AR-42J mediante RT-PCR según se detalla en Materiales y Métodos. bp: pares de bases. La flecha indica el producto obtenido correspondiente al peso esperado. Gel representativo de al menos tres experimentos independientes.

Los resultados mostraron que el páncreas exocrino de rata sintetiza el ARNm de ANF. Asimismo, también expresa ARNm de CNP, otro miembro de la familia de los péptidos natriuréticos. En la línea celular pancreática ARJ42 no se detectó la presencia del ARNm de ninguno de los péptidos (*Figura 49*).

4.2- El páncreas exocrino expresa ANF maduro

Los ensayos de Western Blot mostraron que el ANF se expresa en el páncreas. Se observó una banda de 17 KDa específica que coincide con la altura de la banda observada en el atrio cardíaco (control positivo) (*Figura 50 A*). Las diferencias en la intensidad de la marca en ambos tejidos se atribuyen a que el atrio sintetiza grandes cantidades de ANF. Asimismo, se evaluó si los niveles de expresión de ANF se modificaban en la pancreatitis aguda, observándose mayores niveles del péptido en la patología (*Figura 50b*).

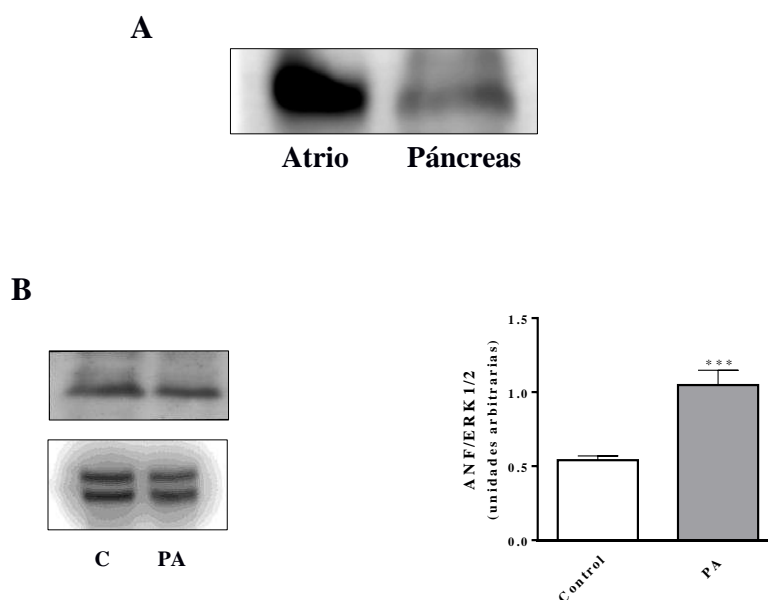


Figura 50: Expresión de ANF. A) Western Blot representativo de ANF (17 kDa) en atrio cardíaco (control positivo) y en páncreas. B) Western Blot representativo de ANF en páncreas de animales controles y con pancreatitis aguda (PA) (izquierda) y análisis densitométrico de al menos tres ensayos independientes (derecha).

4.3- El ANF se localiza en el citoplasma de las células acinares

La localización de ANF se realizó en cortes de tejido pancreático por inmunofluorescencia indirecta. Los estudios mostraron que el ANF en animales controles se localizó en el citoplasma de las células acinares pancreáticas mayoritariamente confinado en la región apical (*Figura 51*). Sin embargo, en los animales con pancreatitis aguda el péptido se observó en todo el citoplasma, probablemente como resultado de las alteraciones en la citoarquitectura de las células acinares que se producen en la patología.

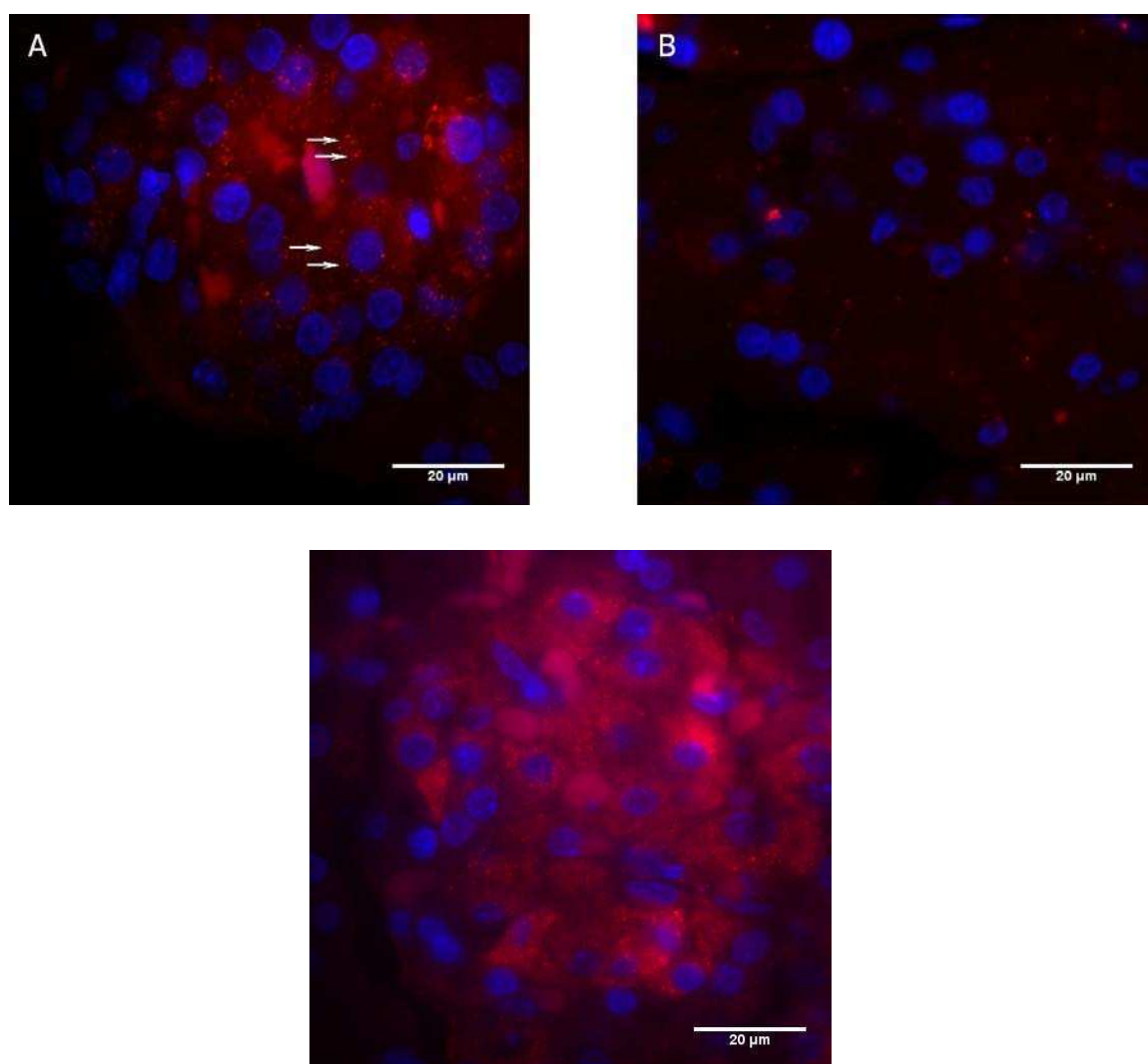


Figura 51: Localización de ANF en el páncreas exocrino. Imágenes representativas de la localización de ANF en páncreas exocrino de animales control y animales con pancreatitis aguda por microscopía de inmunofluorescencia. A) Acinos pancreáticos de animales control (las flechas indican la marca específica de ANF). B) Control negativo. C) Acinos pancreáticos de animales con pancreatitis aguda (las flechas indican la marca específica de ANF). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (1000X).

4.4- El ANF se localiza en gránulos de zimógeno y retículo endoplásmico

A fin de determinar la localización subcelular del ANF en el páncreas exocrino, se realizaron estudios empleando la técnica de inmunomarcación con partículas de oro coloidal. Los resultados determinaron que el ANF se localiza en los gránulos de zimógeno, el RE y en las mitocondrias (*Figuras 52-54*).

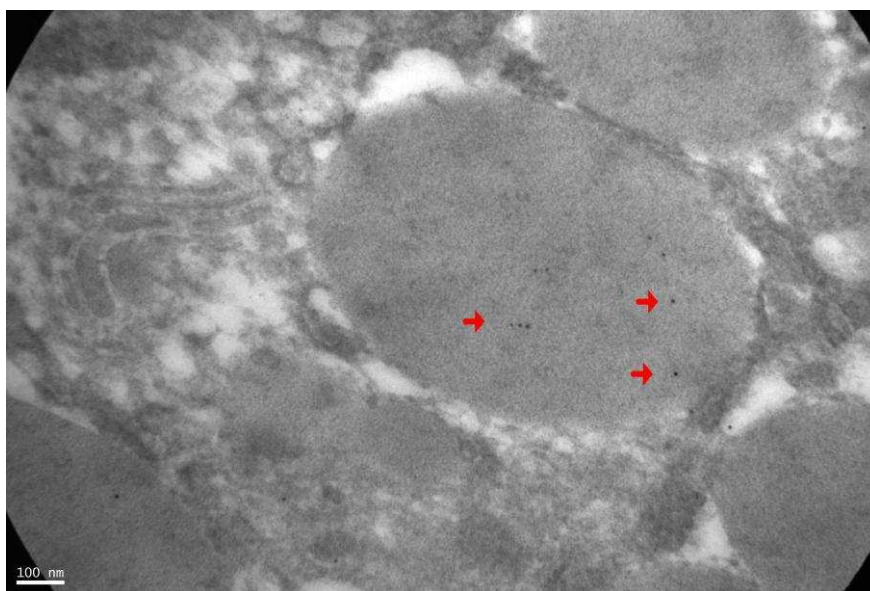


Figura 52: Micrografía electrónica del citoplasma de una célula acinar inmunomarcada con partículas de oro coloidal. Las flechas indican localización del ANF en gránulos de zimógeno (85000X).

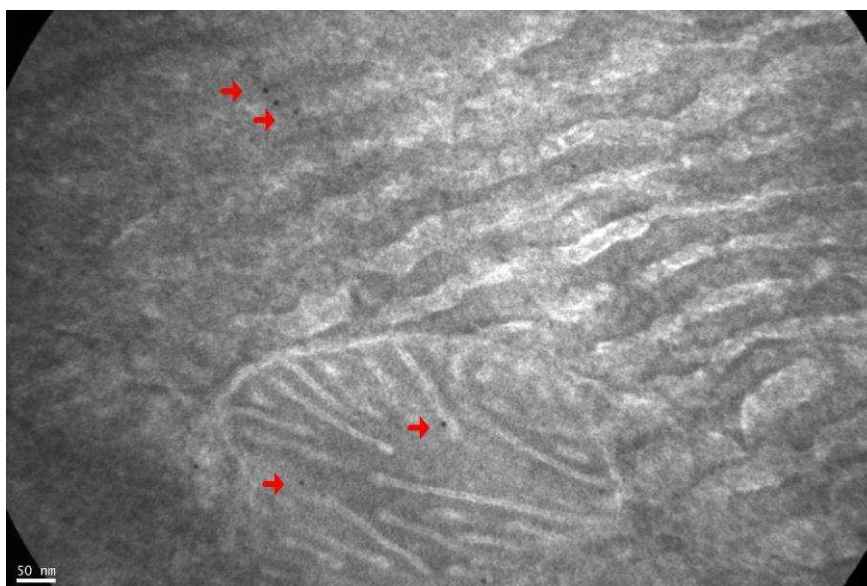


Figura 53: Micrografía electrónica del citoplasma de una célula acinar inmunomarcada con partículas de oro coloidal. Las flechas indican localización del ANF en RE y mitocondrias (140000X).

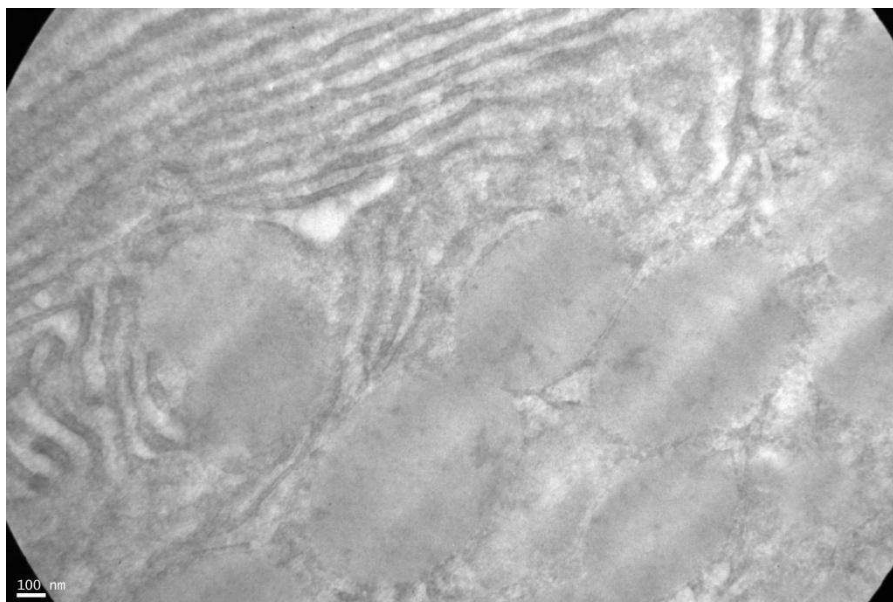


Figura 54. Control negativo de inmunomarcación con partículas de oro coloidal. Micrografía electrónica del citoplasma de una célula acinar (50000X).

En los animales tratados con ceruleína, si bien el ANF también se localiza en los gránulos de zimógeno, RE y mitocondrias, se observa marca específica dispersa por el citoplasma (*Figura 55*). Este hallazgo coincide con lo observado por microscopía de inmunofluorescencia, donde la marca del ANF también aparece dispersa en el citoplasma.

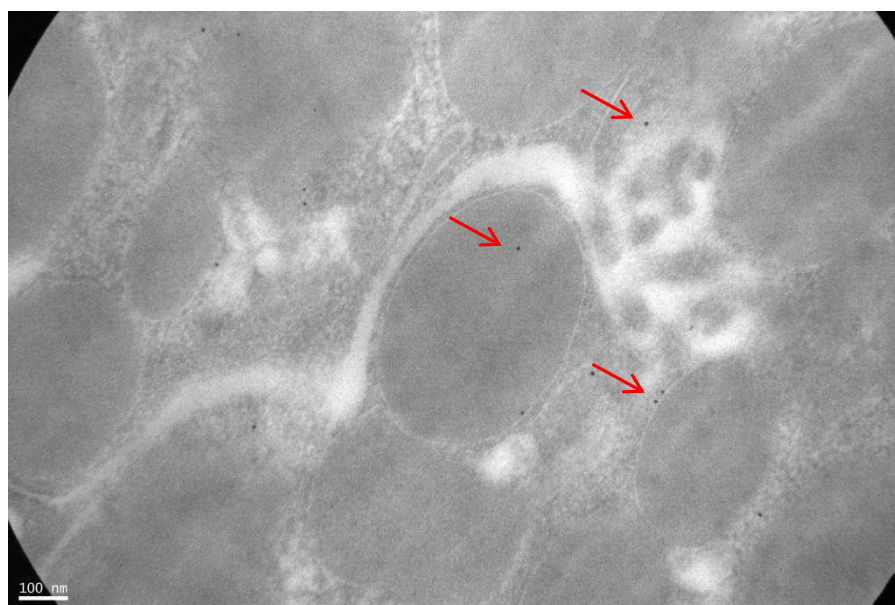


Figura 55. Micrografía electrónica del citoplasma de una célula acinar de rata con pancreatitis aguda inmunomarcada con partículas de oro coloidal. Las flechas indican localización del ANF los gránulos de zimógeno y en el citoplasma (85000X).

La localización subcelular de ANF en RE y gránulos de zimógeno sugiere fuertemente que el péptido es sintetizado por las células acinares. Si bien se localizó asimismo en las mitocondrias, al presente su importancia fisiológica en dicha organela es desconocida.

4.5- El receptor NPR-C se localiza en la región basolateral de los acinos pancreáticos

En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que el páncreas de rata expresa el ARNm de los tres receptores de los péptidos natriuréticos, y en particular el NPR-C, principal mediador de los efectos del ANF en páncreas exocrino (*Sabbatini y col., 2007a*). Con el propósito de determinar su localización en la célula acinar, realizamos estudios de microscopía de inmunofluorescencia. Los resultados mostraron que el receptor NPR-C se localiza principalmente en la membrana basolateral de las células acinares, donde se localizan asimismo los receptores de todos los secretagos del páncreas (*Figura 56*).

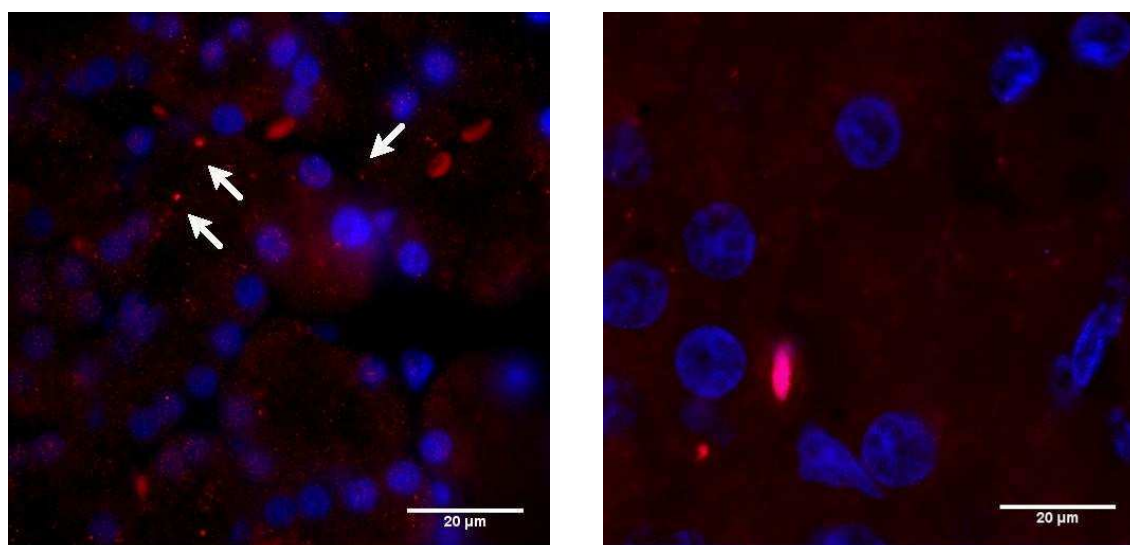


Figura 56: Localización *del receptor NPR-C en páncreas exocrino de rata*. Imágen representativa de la localización del receptor NPR-C en páncreas exocrino de animales controles por microscopía de inmunofluorescencia. A: Acinos pancreáticos. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. Las flechas indican la marca específica de NPR-C. B) Control negativo.

Se evaluó asimismo por la técnica de Western Blot si la expresión del receptor NPR-C sufría variaciones en la pancreatitis aguda. Los resultados mostraron que la expresión de NPR-C no se modifica en la patología (*Figura 57*).

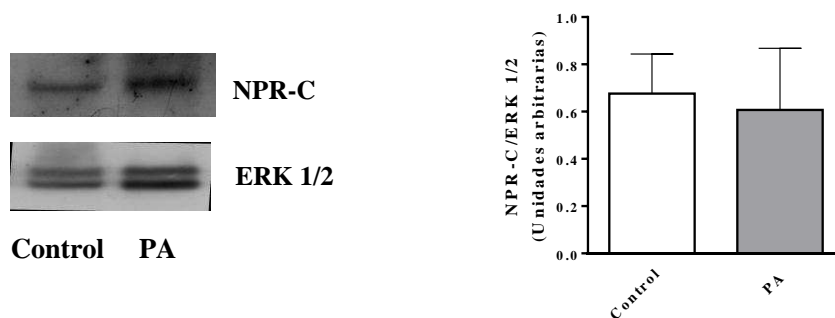


Figura 57: Expresión del receptor NPR-C en páncreas. La expresión del receptor NPR- C se determinó por Western Blot según se detalla en Materiales y Métodos. Panel izquierdo: Western Blots representativos de NPR-C (64-66 kDa) y ERK 1/2 (42-44 Kda) en páncreas de animales controles y con pancreatitis aguda (PA). Panel derecho: Análisis densitométrico de al menos tres ensayos independientes. Número de experimentos: 4-6

Los hallazgos de este trabajo de tesis permiten afirmar que en etapas tempranas de la pancreatitis aguda el ANF atenúa la respuesta inflamatoria y estimula la muerte celular por apoptosis. Estas observaciones guardan correlación con trabajos previos de nuestro laboratorio en los que demostramos que el ANF disminuye la actividad del tripsinógeno intrapancreático y los niveles de amilasa plasmática (*Ventimiglia y col., 2015*). Asimismo, el presente estudio muestra que el páncreas exocrino de rata es una fuente extracardíaca de síntesis y expresión de ANF, lo que avala la importancia fisiológica de los estudios funcionales en páncreas exocrino previamente realizados (*Sabbatini y col., 2003, 2007a y 2007b*). En su conjunto los hallazgos permiten asumir que el ANF sería un regulador del páncreas exocrino en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.

La pancreatitis aguda es una entidad nosológica prevalente que se caracteriza por la autodigestión del páncreas exocrino inducida por la activación *in situ* de las enzimas que el tejido produce. Si bien su patogénesis continua sin estar esclarecida, distintos trabajos en los últimos años sustentan que la activación del tripsinógeno y del factor de transcripción NF- κ B en la célula acinar son los eventos iniciales responsables de desencadenarla (*Gukovsky y col., 1998; Hietaranta y col., 2001*). La activación del tripsinógeno dentro del páncreas dispara una cascada enzimática que genera la autodigestión de la glándula, provocando la necrosis del tejido y la posterior liberación de mediadores inflamatorios (*Tonsi y col., 2009*). El factor de transcripción NF- κ B es un regulador clave de diversos procesos biológicos, como la supervivencia celular, la respuesta al estrés y la diferenciación en distintos tipos celulares. Mientras que su activación es requerida para proteger a los organismos de agentes tanto externos como internos, su función exacerbada puede llevar a distintas alteraciones fisiopatológicas como inflamación crónica o cáncer (*Shih y col., 2011*). En la pancreatitis aguda, la activación de NF- κ B es responsable de desencadenar la respuesta inflamatoria local mediante la inducción de la síntesis y expresión de los principales mediadores inflamatorios, como el TNF- α , IL-1 β e IL-6 (*Gukovsky y col., 1998; Han y col., 2001*). Una respuesta inflamatoria excesiva en el páncreas propaga el daño local a órganos distantes

llevando a falla multiorgánica, principal causa de muerte en la pancreatitis aguda (*Bhatia y col., 2000*).

Durante años se consideró que la activación del tripsinógeno dentro de la célula era el evento disparador de la pancreatitis aguda, responsable de provocar tanto el daño celular como el inicio de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, durante la última década se ha demostrado que, si bien la activación del tripsinógeno se produce al inicio de la patología y es un factor responsable de desencadenarla, su acción sólo explica una parte de la patogénesis ya que no es suficiente para iniciar la respuesta inflamatoria, aunque contribuye fuertemente a sostenerla (*Sah y col., 2013*). Estudios recientes mostraron que el factor de transcripción NF- κ B, en forma independiente a la acción de la tripsina, es el responsable de iniciar la respuesta inflamatoria (*Kim, 2011*). Diversos trabajos realizados en distintos modelos animales de la patología mostraron que la administración de inhibidores de proteasas atenúa la pancreatitis aguda pero no inhibe su desarrollo (*Halangk y col., 2000; Van Acker y col., 2002 y 2007*). Asimismo, estudios de revisión sistemática de tratamientos clínicos muestran que la administración de inhibidores de proteasas es en verdad una terapéutica poco eficiente (*Schmid y col., 1996; Singh y Chari, 2005; Seta y col., 2014*). Estas evidencias confirman que la inhibición de la tripsina resuelve parcialmente la patología. En los últimos años las investigaciones se han focalizado en el NF- κ B como posible blanco terapéutico (*Rakonczay y col., 2008; Sah y Saluja, 2011*).

Desde su descubrimiento el ANF ha sido objeto de numerosos estudios a nivel cardiovascular y renal dadas sus propiedades vasoactivas, diuréticas y natriuréticas habiéndose reportado importantes hallazgos al respecto tanto a nivel fisiológico como fisiopatológico. Incluso se han llevado a cabo estudios clínicos en relación su posible papel terapéutico en patologías cardiovasculares como la insuficiencia cardíaca o la hipertensión arterial. De hecho, en la actualidad el ANF y en BNP, así como también los fragmentos terminales de sus prohormonas (NT-proANP y NT-proBNP) son empleados en la clínica como biomarcadores diagnósticos de la

insuficiencia cardíaca (*McMurray y col., 2012; Yancy y col., 2013*)

El avance de las investigaciones ha mostrado que las acciones biológicas del ANF no se limitan al sistema cardiovascular o renal, sino que se extienden a otros como el sistema digestivo. El primer trabajo reportado sobre un efecto a nivel del sistema digestivo fue realizado por un investigador argentino, quien demostró que el ANF regula el transporte de sodio y glucosa en el intestino (*Martínez Seeber y col., 1986*). Estudios posteriores de nuestro laboratorio mostraron que este péptido regula la funcionalidad del hígado, glándulas salivales y páncreas (*Bianciotti y col., 1993; 1994; 1996, 1998; Sabbatini y col., 2003; 2007; Ventimiglia y col., 2008; Rodríguez y col., 2011*). Trabajos recientes postulan al ANF como una posible citoquina en virtud a distintos hallazgos obtenidos en células del sistema inmunológico (*De Vito, 2014*). Por lo expuesto y sobre la base de estudios previos de nuestro laboratorio que mostraban que el ANF reducía la activación del tripsinógeno y los niveles de amilasa pancreática se decidió estudiar el papel del ANF en la respuesta inflamatoria que se desencadena en la pancreatitis aguda.

Debido al protagonismo central del factor de transcripción NF- κ B en el inicio de la patología se estudió si el ANF modificaba su activación. Los resultados mostraron que en el modelo de pancreatitis por administración de ceruleína está incrementada la activación de NF- κ B, de acuerdo a lo reportado en bibliografía (*Algül y col., 2002; Kim, 2011*). No obstante, el ANF redujo significativamente la activación de NF- κ B respecto de los animales tratados sólo con ceruleína o en combinación con secretina. Estos resultados se correlacionan con estudios previos que muestran que el ANF inhibe la activación de NF- κ B en macrófagos activados, disminuyendo su respuesta inflamatoria (*Tsukagoshi y col., 2001*). La secretina también disminuyó la activación del factor de transcripción, si bien en presencia de ANF la reducción fue mayor, lo que sugiere que el efecto del ANF sería independiente y aditivo al de la hormona. No obstante, la respuesta de la secretina fue inesperada, ya que estudios recientes de nuestro laboratorio empleando el mismo esquema experimental muestran que en la pancreatitis aguda la secretina agrava la patología ya

que incrementa la actividad del tripsinógeno intrapancreático y los niveles de amilasa plasmática. Asimismo, estos cambios bioquímicos se acompañan de profundas alteraciones de la morfología de las células acinares, ya que se observa un mayor número de vacuolas y áreas de necrosis. (Ventimiglia y col., 2015). En el páncreas exocrino demostramos que el ANF inhibe la señalización de secretina, ya que estimula la salida del AMPc inducido por la hormona a través del transportador MRP4 (Sabbatini y col., 2007; Rodriguez y col., 2011). La secretina agrava la pancreatitis aguda como resultado del incremento de AMPc intracelular y el ANF inhibe su acción al estimular la salida del segundo mensajero a través del transportador MRP4. La inhibición farmacológica del transportador confirma la importancia de la elevación de los niveles intracelulares de AMPc en las etapas tempranas de la pancreatitis aguda (Ventimiglia y col., 2015). Estudios previos de otros autores ya habían demostrado *in vitro* que los ligandos que aumentan el AMPc sensibilizan los gránulos de zimógeno predisponiendo al desarrollo de pancreatitis aguda (Lu y col., 2003; Perides y col., 2005). Por lo expuesto, era esperable que los animales tratados con ceruleina y secretina mostraran un aumento en la activación de NF- κ B. En virtud a que, como se comentó previamente, la activación del tripsinógeno y de NF- κ B son procesos paralelos e independientes, la secretina agravaría la patología a través de una mayor activación del tripsinógeno. La respuesta inhibitoria de ANF sobre la activación de NF- κ B, podría asimismo traer aparejado un menor nivel intracelular de AMPc, ya que en hepatocitos se demostró que la inhibición de NF- κ B disminuye la activación de la vía AMPc/PKA (Ke y col., 2015). El ANF es un regulador negativo de los niveles de AMPc en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (pancreatitis aguda) (Sabbatini y col., 2007; Ventimiglia y col., 2015) por lo que además de disminuir los niveles de AMPc mediante la extrusión del segundo mensajero a través de MRP4, podría asimismo en disminuir el segundo mensajero de manera indirecta al atenuar la activación de NF- κ B.

Al reducir la activación del factor de transcripción el ANF disminuye la severidad de la pancreatitis ya que diversos estudios muestran claramente que a mayor activación de NF- κ B,

mayor expresión de citoquinas, lo que se traduce en una mayor gravedad de la patología (*Satoh y col., 1999; Steinle y col., 1999; Huang y col., 2013*). Más aun, la activación persistente del factor de transcripción se asocia al desarrollo de fibrosis del páncreas como ocurre en la pancreatitis crónica (*Huang y col., 2013*).

Los hallazgos en relación a la activación del factor de transcripción NF- κ B en presencia de ANF se confirmaron de manera indirecta a través de la evaluación del nivel de expresión de I κ B- α , proteína que secuestra e inactiva NF- κ B en el citoplasma (*Shih y col., 2011*). En la pancreatitis aguda y otros procesos de naturaleza inflamatoria, I κ B- α se degrada permitiendo así la translocación al núcleo de la subunidad p65 (RelA) de NF- κ B para inducir la expresión de citoquinas y enzimas pro-inflamatorias (*Gukovsky y col., 1998*).

La activación de NF- κ B estimula la síntesis y expresión de distintos mediadores inflamatorios como TNF- α (*Gukovskaya y col., 1997*). Si bien TNF- α producido principalmente por macrófagos y leucocitos en respuesta a una infección o inflamación, se demostró que la célula acinar pancreática es capaz de producir y secretar esta citoquina (*Gukovskaya y col., 1997*). El TNF- α actúa a través de dos tipos de receptores de membrana TNF- α 1 (TNRF-1) y TNF- α 2 (TNRF- α 2), ambos presentes en la célula acinar (*Gukovskaya y col., 1997*). El NF- κ B promueve la transcripción de TNF- α , pero a su vez, esta citoquina induce activación de NF- κ B. De esta forma, es un regulador clave en procesos inflamatorios agudos ya que promueve y amplifica la respuesta inflamatoria a través de la inducción de la expresión de otros mediadores pro-inflamatorios vía NF- κ B (*Heller y Krönke, 1994*).

Se considera que en los estadios tempranos de la pancreatitis aguda la activación de NF- κ B es responsable del aumento inicial de TNF- α en la célula acinar, pero luego este aumento es sostenido por los leucocitos infiltrantes. Asimismo, como TNF- α induce la activación de NF- κ B, se produce una retroalimentación positiva que sostiene y exagera la respuesta inflamatoria, lo que lo convierte en un actor central en la patogénesis de la pancreatitis aguda al amplificar la respuesta

inflamatoria llevando a la propagación del daño a otros tejidos (*Malleo y col, 2007*). Al reducir el ANF el grado de activación de NF- κ B en la pancreatitis aguda, era esperable que el ANF disminuya asimismo los niveles intrapancreáticos de TNF- α . En efecto, los animales infundidos con ANF previo a la inducción de la pancreatitis aguda presentaron niveles significativamente inferiores de TNF- α intrapancreáticos, resultando similares a los de los animales del grupo control. Si bien la secretina disminuyó el grado de activación de NF- κ B no modificó los niveles intrapancreáticos de TNF- α en la pancreatitis aguda, lo que indica que otros mediadores también estimulan su producción. Este hallazgo asimismo explicaría también porque la secretina agrava la patología en estadios tempranos.

El TNF- α no inicia la respuesta inflamatoria, pero la sostiene y amplifica, por lo que el ANF al reducir esta citoquina limitaría la inflamación del tejido y el daño celular. Si bien el TNF α es responsable en parte de la propagación de la inflamación a otros órganos como el pulmón, el modelo de pancreatitis aguda utilizado en este trabajo de tesis no tiene compromiso sistémico (los niveles plasmáticos de TNF- α son similares a los controles), por lo que no puede evaluarse este aspecto, aunque sería esperable que en un modelo más severo de la patología el ANF limite asimismo el compromiso de otros órganos.

La activación de las MAPKs es un evento temprano que contribuye al desarrollo de la pancreatitis aguda. La activación de estas quinasas se asocia al incremento en los niveles de TNF- α e IL-1 β (*Grady y col., 1996; Samuel y col., 2003 y 2005*). Estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* muestran que la sobre-estimulación inducida por CCK o ceruleína activan ERK1/2 en el páncreas exocrino (*Duan y Williams, 1994*). Asimismo, se demostró en estudios *in vitro* que en las células acinares su inhibición farmacológica disminuye los niveles TNF- α (*Samuel y col., 2006*). Se considera en la actualidad que ERK es una de las vías que activan NF- κ B por lo que se la propone como blanco terapéutico (*Irrera y col., 2014*). Al evaluar la expresión de ERK1/2 en la pancreatitis aguda se observó que, acorde a lo reportado en la literatura, la quinasa se encuentra

activada, siendo la activación mayor en presencia de secretina. El ANF inhibió significativamente el grado de fosforilación de ERK, tanto en presencia como en ausencia de secretina. Este hallazgo se correlaciona con los menores niveles de TNF- α , sugiriendo que el ANF podría disminuir el TNF- α también a través de la inhibición de la activación de ERK durante los estadios tempranos de la pancreatitis aguda. La inhibición de ERK 1/2 mediada por ANF fue previamente descrita en otros procesos celulares. Así se demostró que el ANF inhibe la proliferación de distintas líneas tumorales a través de la inhibición de estas quinasas (*Manimala y col., 2013*). Un estudio reciente muestra que la vía de ERK 1/2 está implicada en el crecimiento y diferenciación de las células acinares (*Holtz y col., 2014*). Estos hallazgos sugieren que el ANF en el páncreas podría asimismo participar en la regulación y proliferación celular.

En la pancreatitis aguda la activación de NF- κ B constituye el disparador de la respuesta inflamatoria, pero distintos actores participan amplificando este complejo proceso. Así, en la inflamación la enzima la fosfolipasa A2, activada por el aumento de calcio intracelular y diversas quinasas, libera rápidamente ácido araquidónico de la membrana el que luego por acción enzimática (COXs y lipooxigenasas) da origen a las prostaglandinas y leucotrienos, mediadores lipídicos con actividad biológica que se comportan como señales intracelulares y extracelulares regulando la respuesta inflamatoria.

Las PGs se sintetizan por acción de las enzimas COX-1, de expresión constitutiva, y COX-2, de expresión inducible, siendo esta última la que posee un papel relevante en la inflamación. Las PGs se dividen en series según sus características estructurales y se designan con letras (PGD, PGE, PGF, PGG y PGH) y un número que indica el número de dobles enlaces del compuesto COX-2 (*Bakhle y Botting, 1996*).

Los estadios iniciales de la pancreatitis aguda se correlacionan con un aumento significativo de los niveles de COX-2 y distintos trabajos muestran que su inhibición reduce las áreas necróticas, la vacuolización acinar y la edematización tisular, así como también la infiltración

leucocitaria, sustentando la participación de la enzima y su metabolito, la PGE₂, en la pancreatitis aguda (*Van Ooijen y col., 1988; Vollmar y col., 1989; Ethridge y col., 2002; Slogoff y col., 2004*). El aumento en la expresión de COX-2 promueve la respuesta inflamatoria a través de PGs pero también genera 15dPGJ₂, metabolito de PGD₂ que estimula PPAR γ , regulador negativo de la respuesta inflamatoria (*Tsatsanis y col., 2006*).

Cuando se determinó la expresión de COX-2 en los animales tratados con ceruleína se observó un aumento significativo de la enzima, acorde a lo reportado en la bibliografía (*Song y col., 2002; Foitzik y col., 2003*). Sin embargo, la secretina llamativamente redujo la expresión de COX-2, mostrando la hormona un efecto similar al observado en la activación del factor de transcripción NF- κ B. El tratamiento con ANF inhibió significativamente la expresión de COX-2, tanto en ausencia como en presencia de la secretina.

La activación de COX-2 en las células acinares lleva a la formación de PGE₂, que contribuye a la exacerbación y propagación de la respuesta inflamatoria ya que induce vasodilatación y aumento de la permeabilidad de las vénulas postcapilares, lo que favorece la formación de edemas (*Zhou y col., 1994*). Los niveles intrapancreáticos de PGE₂ mostraron un comportamiento similar al observado en la expresión de la enzima COX-2. El tratamiento con ceruleína incrementó los niveles intrapancreáticos de PGE₂, pero en presencia de secretina se redujeron significativamente. Sin embargo, el ANF disminuyó más aun los niveles intrapancreáticos de PGE₂ tanto en presencia como en ausencia de secretina.

Estos resultados son consistentes con lo observado por otros autores, quienes demostraron que el ANF reduce los niveles intracelulares de PGE₂ en macrófagos activados al inhibir la síntesis de ARNm y la expresión de la enzima COX-2 a través del receptor NPR-C, correlacionándose esta respuesta con la reducción de AMPc intracelular (*Kiemer y col., 2002*). En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que el ANF estimula la extrusión de AMPc inducido por secretina a través del transportador MRP4 (*Rodríguez y col., 2011*). Este transportador de la familia ABC

además de transportar AMPc al medio extracelular, presenta alta selectividad por la extrusión de PGE₁ y PGE₂ (Reid y col., 2003; Sauna y col., 2004; Rius y col., 2005; Lin y col., 2008). Estas observaciones permiten postular que el efecto del ANF en los estadios tempranos de la pancreatitis aguda sobre el sistema COX-2/ PGE₂ sería por un efecto directo sobre la expresión de la enzima COX-2 pero también a través de la extrusión de la PGE₂ a través de MRP4.

Uno de los reguladores de la expresión de COX-2 es el factor de transcripción PPAR γ , miembro de la familia de los receptores PPARs, que incluye al menos tres isoformas: PPAR α , PPAR δ , y PPAR γ (Mangelsdorf y col., 1995; Inoue y col., 2000). Al ser activados por ligandos específicos, como ácidos grasos o eicosanoides entre otros, estos receptores se heterodimerizan con el receptor X retinoide (RxR) e inducen la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico, la homeostasis de la glucosa, la proliferación y diferenciación celular (Chinetti y col., 2003). En particular, PPAR γ posee un papel central en la adipogénesis y regulación de la glucosa (Chawla y col., 1994; Nolan y col., 1994). Asimismo, PPAR γ posee funciones anti-inflamatorias al reducir la secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en macrófagos (Jiang y col., 1998). La administración de agonistas de PPAR γ en modelos animales de pancreatitis aguda atenúa la respuesta inflamatoria ya que inhibe NF- κ B y COX-2, disminuye TNF- α e IL-6, inhibe moléculas de adhesión y estimula la muerte celular por apoptosis (Yang y Frucht, 2001; Xu y col., 2007; 2013). Se demostró que PPAR γ induce apoptosis mediante un mecanismo que involucra la inhibición de COX-2 y, probablemente, la degradación o extrusión al citoplasma de NF- κ B, mostrando así un papel beneficioso en la pancreatitis aguda. Al evaluar el nivel de expresión de PPAR γ en los distintos grupos experimentales, se observó que el tratamiento con ceruleína disminuyó su expresión, acorde a lo descrito en la bibliografía. El tratamiento con ANF en presencia de secretina, aumentó la expresión de PPAR γ . Distintos autores reportaron que los ligandos que incrementan la expresión de este factor de transcripción durante la pancreatitis aguda, mejoran el perfil de la patología. Por lo expuesto el ANF tendría un efecto beneficioso al aumentar

la expresión de PPAR γ , si bien el efecto se observó en presencia de secretina.

Otra de las enzimas que se induce en los estadios tempranos de la pancreatitis aguda es la iNOS, isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa, responsable de la producción de elevadas concentraciones de NO durante la patología (*Konturek, 1994; Molero y col., 1995; Ang y col., 2009*). El NO media diversos procesos fisiológicos actuando de manera paracrina sobre las células diana mediante la generación de GMPc. Sin embargo, cuando se produce en elevadas concentraciones al ser un radical libre del oxígeno, puede actuar como un fuerte agente citotóxico (*Aktan, 2004*). El NO es un gas que se sintetiza a partir de la L-arginina por las óxido nítrico sintasas. Las funciones fisiológicas son mediadas por bajas concentraciones de NO producidas por la nNOS y la eNOS. En cambio, las acciones citotóxicas son producto de altas concentraciones de NO al ser activada iNOS (*Moncada y col., 1991*). Durante la pancreatitis aguda la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e interferón γ inducen la expresión de la iNOS y la consecuente producción de NO (*Um y col., 2003*). Asimismo, se observó que los pacientes con pancreatitis aguda que presentan elevados niveles de NO tienen mayor riesgo de sepsis y mortalidad (*Mettu y col., 2003*). Los ratones *knockout* para el gen de la iNOS muestran atenuación del desarrollo de pancreatitis aguda reflejado en un menor daño acinar y una disminución en la expresión de moléculas de adhesión (P-selectina e ICAM-I) así como también en una menor infiltración neutrofílica (*Cuzzocrea y col., 2002*). Al evaluar la expresión de iNOS en los distintos grupos experimentales se observó un aumento en la expresión de la enzima en los animales con pancreatitis aguda, pero el ANF redujo significativamente la expresión de la enzima tanto en presencia como en ausencia de la secretina en los animales tratados con ceruleina. Asimismo, la secretina también atenuó la expresión de la enzima en el mismo grupo experimental. Estos hallazgos son consistentes con los estudios de otros autores que demostraron que el ANF reduce la liberación de NO de macrófagos a través de la inhibición de la expresión de iNOS (*Kiemer y Vollmar, 1998, 2001a y 2001b*). La inhibición en la expresión de iNOS no solo implica menor

producción de NO, sino también menor actividad de COX-2. El NO tiene la capacidad de incrementar la actividad catalítica de la enzima, ya que aumenta la afinidad de enzimas que contienen hierro (*Tsatsanis y col., 2006*).

En la pancreatitis aguda la respuesta inflamatoria es iniciada por las células acinares, pero participan células endoteliales, linfocitos, monocitos, macrófagos y neutrófilos (*Shrivastava y Bhatia, 2010*). En los estadios tempranos de la pancreatitis aguda, la activación *in situ* del tripsinógeno a tripsina induce la expresión de moléculas de adhesión y la activación de NF- κ B promueve la síntesis de moléculas pro-inflamatorias por parte de la célula acinar, que en conjunto estimulan la infiltración de neutrófilos en el páncreas (*Hartwig y col., 1999*). Los neutrófilos activados liberan altas concentraciones de agentes oxidantes y citotóxicos propagando el daño focal hacia el resto del páncreas exocrino. Si la inflamación persiste, se produce un segundo influjo de neutrófilos al páncreas que pueden propagar y agravar el daño hacia otros tejidos generando una respuesta inflamatoria multisistémica. Evidencias recientes, sostienen que la activación del tripsinógeno induce infiltrado de neutrófilos y que, una vez en el páncreas, estos neutrófilos promueven una segunda activación de tripsinógeno, sosteniendo y propagando la patología (*Yang y col., 2015*). En el presente trabajo se evaluó el grado de infiltración neutrofílica en forma indirecta a través de medición intrapancreática de la actividad de una de sus principales enzimas con funciones citotóxicas, la MPO (*Kolaczowska y Kubes, 2013*). Se observó que el tratamiento con ceruleína incrementó la actividad de MPO, como indica la bibliografía (*Brady y col., 2002*). Sin embargo, el ANF disminuyó significativamente la actividad de la enzima, y el mismo comportamiento se observó en presencia de secretina. Estos resultados indican que en los estadios tempranos de la pancreatitis aguda el ANF y la secretina inhiben la infiltración de neutrófilos. No obstante, otros estudios muestran que en el tejido cardíaco el ANF favorece la infiltración y activación de neutrófilos (*Wiedermann y col., 1992; Biselli y col., 1996*). Es posible que el efecto del ANF sea dependiente del tejido y del contexto fisiológico o fisiopatológico. Llamativamente,

los animales tratados solo con ANF mostraron un leve aumento de la actividad de MPO, indicando que el péptido natriurético estimula levemente el influjo de neutrófilos en animales controles. El significado de este hallazgo es al presente desconocido.

La pancreatitis aguda, tanto clínica como experimental, se caracteriza por la muerte celular progresiva. Los modelos experimentales sustentan que la muerte de la célula acinar ocurre tanto por necrosis como por apoptosis, desconociéndose aún qué mecanismos favorecen más uno u otro destino (*Kaiser y col., 1995; Gukovskaya y col., 1996; Bassi y col., 2003; Connor y Neoptolemos, 2004*). La magnitud de la activación del tripsinógeno y la de la respuesta inflamatoria se relaciona con el tipo de muerte celular. La necrosis se caracteriza por una pérdida progresiva de la integridad de la membrana plasmática, seguido de un rápido ingreso de calcio, sodio y agua que resulta en edema intracelular (*swelling*). Este proceso culmina con la fragmentación celular que libera el contenido citoplasmático al medio extracelular, con la consecuente inflamación e infiltración leucocitaria (*Barros y col., 2001; Scaffidi y col., 2002; Bae y col., 2014*). En el pasado se consideraba que la necrosis era un proceso pasivo gatillado por la depleción de ATP, pero estudios posteriores mostraron que en realidad hay mecanismos activos implicados en los que participan la sobrecarga de calcio y cambios en la permeabilidad mitocondrial (*Padanilam, 2003; Bhatia, 2004*). La apoptosis, en cambio, es un mecanismo de muerte celular programada y fuertemente regulado, en el que se preserva la integridad de la membrana plasmática y, en la gran mayoría de los casos, es mediado por enzimas de la familia de las caspasas (*Hengartner, 2000*). Existen dos vías distintas en la apoptosis mediada por caspasas, la vía extrínseca y la vía intrínseca, que se diferencian en las señales que las disparan y en las caspasas que inician el proceso, pero suelen convergen en la misma caspasa efectora. La vía extrínseca es dependiente de la activación de caspasa-8 y se induce generalmente a través de receptores de membrana conocidos como receptores de muerte, como los receptores de TNF- α . La vía intrínseca, en cambio, implica la permeabilización de la membrana mitocondrial con la

subsecuente liberación del citocromo c y las proteínas Apaf-1 y procaspasa-9. Estos componentes pro-apoptóticos conforman luego, en el citoplasma, un complejo que lleva a la formación de caspasa-9 activa. Esta vía puede ser activada por señales externas o internas, como el daño en el ADN (*Scaffidi y col., 1998; Wolf y Green, 1999*). Luego de su activación, tanto la caspasa-8 como la caspasa-9 activan a una caspasa efectora, en general la caspasa-3. Esta caspasa es responsable de clivar diferentes proteínas clave requeridas para el normal funcionamiento y la sobrevivencia celular, como proteínas reguladoras de la transcripción y traducción, proteínas reguladoras del ciclo celular y proteínas que participan en la replicación y reparación del DNA. Se han descrito al menos 280 proteínas *targets* de las caspasas efectoras (*Fischer y col., 2003; Chaitanya y col., 2010*).

La muerte acinar por necrosis es una de las principales complicaciones en la pancreatitis aguda clínica (*Bassi y col., 2003; Connor y Neoptolemos, 2004*). Asimismo, aquellos modelos experimentales que representan formas atenuadas de la patología (pancreatitis edematosa) están asociados con una mayor proporción de apoptosis frente a la necrosis, mientras que los modelos más severos (pancreatitis necrotizante) presentan mayor proporción de necrosis. Por lo expuesto, en las últimas décadas se ha propuesto que aquellos agentes que modifiquen la relación necrosis/apoptosis podrían tener un papel protector en la pancreatitis aguda (*Meraninova y col., 2006*).

En trabajos previos de nuestro laboratorio, empleando el mismo modelo animal de pancreatitis aguda, se observó mediante estudios de microscopía óptica que aquellos grupos experimentales tratados con ANF presentaban células acinares con núcleos de aspecto picnóticos y que este fenómeno no era dependiente del mecanismo de extrusión de AMPc a través del transportador MRP4 (*Ventimiglia y col., 2015*). Estas observaciones sugerían que el ANF estimularía la apoptosis en la pancreatitis aguda. En efecto, en el presente trabajo de tesis se observó que el modelo de pancreatitis aguda inducido por administración de ceruleina presenta apoptosis acorde a la descrito en bibliografía (*Meraninova y col., 2006*) En presencia de secretina

la cantidad de núcleos apoptóticos fue significativamente mayor pero el tratamiento con ANF incrementó aún más la presencia de núcleos apoptóticos, observándose asimismo un efecto aditivo con la secretina. Este resultado muestra que el péptido natriurético es un fuerte inductor de la apoptosis en la pancreatitis aguda. Este hallazgo se reafirmó al evaluar la actividad y expresión de caspasa-3, que se encontró significativamente incrementada en los animales tratados con ANF. Si bien los animales tratados con ceruleina y secretina mostraron un incremento en el número de núcleos apoptóticos, este hallazgo no se correlacionó con la actividad o expresión de la enzima caspasa 3. En el modelo de pancreatitis aguda por administración de ceruleina en rata, la actividad de la enzima aumenta a partir de los 30 min de administrada la primera inyección del agonista de CCK pero se incrementa aún más a los 120 min para luego sostenerse durante 7 h. Acorde al protocolo experimental empleado en el presente trabajo, los animales se sacrificaron a las 5 h de administrada la primera inyección de ceruleina, tiempo en el que la actividad de la enzima está aumentada. Si bien en los animales que recibieron ceruleina y secretina no se correlacionó el aumento de núcleos apoptóticos con la actividad y expresión de la enzima, cabe señalar que además de ser previa la activación de la enzima a la aparición de los núcleos apoptóticos, este grupo experimental presenta asimismo extensas áreas de necrosis según fuera reportado en estudios previos, lo que explicaría la falta de correlación (*Ventimiglia y col., 2015*).

La activación de caspasa-3 promueve el clivaje de una amplia gama de proteínas, siendo una de las primeras la proteína nuclear PARP-1, cuya función es la reparación del ADN en respuesta al estrés celular mediante la adición de polímeros de ADP-ribosa (*Dantzer y col., 2000*). No obstante, se ha descrito una amplia variedad de funciones de PARP-1, como su participación en la transcripción, en distintos tipos de muerte celular, en el remodelamiento cardíaco, y en la regulación de los astrocitos y células de la microglía, entre otras (*Xiao y col., 2005; Albadawi y col., 2006; Phulwani y Kielian, 2008; von Lukowicz y col., 2008; Chaitanya y col., 2010*). El clivaje de PARP-1 por caspasa-3 es considerado un marcador característico de apoptosis,

resultando en un fragmento catalítico de 89 KDa con escasa afinidad por el DNA que transloca al citoplasma (*Tewari y col., 1995; Soldani y col., 2001*). Por lo tanto, evaluamos también la presencia del fragmento de 89 KDa como forma indirecta de actividad de caspasa-3. La determinación de este fragmento mostró que los animales tratados con ANF y ceruleína, en presencia o ausencia de secretina, presentan un aumento significativo de la subunidad de 89 KDa de PARP-1, confirmando así que el péptido natriurético estimula la actividad de caspasa-3.

Se midió asimismo la actividad de las enzimas caspasa-8 y caspasa-9, enzimas iniciadoras de las vías extrínseca e intrínseca, respectivamente, las que al activarse convergen en la activación de caspasa 3. La actividad de ambas enzimas se incrementó en todos los grupos tratados con ceruleína (pancreatitis aguda), si bien solo la actividad de caspasa-8 aumentó aún más en presencia de ANF. Es posible que el efecto de ANF sobre las caspasas iniciadoras está diluido temporalmente. No obstante, el efecto observado a nivel de la actividad de las caspasas-8 y -9 el ANF claramente es un inductor de la apoptosis en la pancreatitis aguda, tal como lo sustenta su efecto a nivel de la expresión y actividad de la caspasa efectora (caspasa-3) que se correlacionó positivamente con el número de núcleos apoptóticos.

La caspasa-2 es una enzima altamente conservada cuyo papel fisiológico y/o fisiopatológico no se haya aun claramente definido. En el presente trabajo se observó que, en la pancreatitis aguda, la actividad de la enzima está aumentada, pero no se modificó en presencia de ANF. No obstante, llamativamente en los animales sanos el ANF, en presencia o ausencia de secretina, estimuló significativamente la actividad de caspasa-2 lo que sugiere que el péptido atrial tendría un papel a nivel fisiológico. Esta enzima es una caspasa estructuralmente similar a la caspasa-9, si bien a diferencia de las caspasas iniciadoras, no procesa efectores apoptóticos que necesitan activarse por clivaje proteolítico como las caspasas-3, -6 o -7, lo que sugiere que tendría otros blancos. No obstante, no se sabe realmente si se trata de una caspasa iniciadora o efectora, ya que es sustrato de caspasa-3 y de caspasa-8 (*Van de Craen y col., 1999; Paroni y col., 2001*).

Su mecanismo de activación sigue siendo controversial, ya que se demostró que puede sufrir dimerización y autoactivarse, aunque la mayoría de los estudios sugieren que se activaría frente a estrés celular de distinto origen como la presencia de microorganismos, estrés del retículo endoplásmico o privación de nutrientes. Así se demostró que la caspasa-2 está implicada en la muerte celular inducida por desequilibrios metabólicos, daño del ADN y estrés del retículo endoplásmico, entre otros (*Krumschnabel y col., 2009*). Un estudio reciente muestra que en la pancreatitis aguda p53 promueve la activación de caspasa-2 potenciando la vía intrínseca de la apoptosis, si bien la activación de la caspasa es inversamente proporcional a la magnitud de la respuesta inflamatoria (*Nakamura y col., 2010*).

Los mecanismos que median el efecto pro-apoptótico del ANF en el páncreas exocrino no son dependientes de la disminución de los niveles de AMPc inducidas por el péptido como se demostró en estudios previos (*Ventimiglia y col., 2015*). El nivel intracelular de este segundo mensajero se asocia a inhibición o estimulación de la apoptosis según el tipo celular (*Insel y col., 2012*). Los mecanismos subyacentes del ANF sobre la apoptosis serían directos, ya que el péptido *per se* aumenta el número de núcleos apoptóticos y la actividad de caspasa-3, en animales solo tratados con el péptido, hallazgo que estaría relacionado con la fisiología de la célula acinar. No obstante, podrían asimismo contribuir de manera indirecta los efectos del ANF sobre parámetros de la respuesta inflamatoria que regulan la muerte celular programada en la pancreatitis aguda. El ANF redujo significativamente los niveles intrapancreáticos de PGE₂, y esta PG es inhibidora del proceso de apoptosis (*Sheng y col., 1989; Wang y col., 2005*). Asimismo, existe una relación directamente proporcional entre la infiltración neutrofílica y la extensión de la necrosis en la pancreatitis aguda (*Bhatia, 2004*). En particular, en el modelo de ceruleína en rata se observó que cuando se reduce la infiltración neutrofílica disminuye la presencia de zonas necróticas (*Gukovskaya y col., 1996; Sandoval y col., 1996*). En este sentido, se considera que los neutrófilos pueden convertir a las células acinares en vía de apoptosis hacia la muerte por necrosis en la

pancreatitis aguda (*Bhatia, 2004; Nakamura y col., 2010*). El ANF disminuyó significativamente la actividad de MPO, por lo que la reducción de la infiltración de neutrófilos al páncreas por el ANF favorecería la activación de caspasa-2, lo que se traduciría en una mayor respuesta apoptótica. La disminución de NF-kB inducida por ANF podría ser otro mecanismo involucrado, ya que la activación del factor de transcripción tiene entre otros blancos moléculas inhibitoras de la apoptosis como Bcl-x1 (*Karin 1998; Huang y col., 2013*). Por otra parte, en el contexto de la pancreatitis aguda las caspasas no sólo regulan positivamente la apoptosis, sino que son también reguladoras negativas de la necrosis e inhibitoras de la activación intra-acinar del tripsinógeno (*Gukovskaya y col., 2002*). El ANF atenúa la activación del tripsinógeno también por lo que a través de este mecanismo podría asimismo favorecer la apoptosis al disminuir la necrosis (*Ventimiglia y col., 2015*).

El efecto del ANF sobre la apoptosis pareciera depender del tipo celular y/o del contexto fisiológico o fisiopatológico. Consistente con los hallazgos del presente estudio, distintos trabajos muestran que el ANF induce apoptosis en células endoteliales, cardiomiocitos adultos y neonatales y células musculares lisas a través de un aumento de GMPc inducido por activación de los receptores NPR-A y NPR-B (*Trindade y col., 1995; Pollman y col., 1996; Wu y col., 1997; Suenobu y col., 1999; Filippatos y col., 2001*). En cardiomiocitos neonatales se demostró que el ANF a través de cGMP inhibe la expresión de Mcl-1, homólogo del factor anti-apoptótico de Bcl-2. No obstante, el ANF se comporta como un factor anti-apoptótico en otros tejidos. En este sentido, la inhibición de la apoptosis es uno de los mecanismos por los que el ANF atenúa la disfunción a nivel de la microvasculatura hepática y reduce el daño celular en la isquemia-reperfusión (*Gerwig y col., 2003; Yamada y col., 2013*). Asimismo, se comporta como un factor anti-apoptótico en células de la granulosa de los folículos ováricos, en células estromales de la médula ósea y en la línea celular PC12 (*Fiscus y col., 2001; Dineva y col., 2011; Wong y Fiscus., 2011*).

El hallazgo de que el ANF induce apoptosis y atenúa la respuesta inflamatoria en la pancreatitis aguda tiene una relevancia significativa en el curso de la patología. Existe una correlación directamente proporcional entre la magnitud de la necrosis y la severidad de la enfermedad. Asimismo, el tipo de muerte celular está condicionado por la respuesta inflamatoria, ya que la reducción de la infiltración neutrofílica en el páncreas estimula la apoptosis y reduce la necrosis celular. No obstante, el mecanismo por el que la atenuación de la respuesta inflamatoria regula la muerte celular no se haya esclarecido. Estudios recientes muestran que la atenuación de la inflamación produce activación de la vía Mdm2/p53/caspasa-2 que en conjunto con la vía intrínseca iniciada por caspasa-9 potencian la activación de caspasa-3 incrementando la muerte celular por apoptosis (*Nakamura y col., 2010*). La proteína supresora de tumores p53 lleva a la activación de caspasa-2, la que estimula la liberación de citocromo c y activación de caspasa-9 (*Tinel y Tschopp, 2004; Vakifahmetoglu y col., 2006*). Se demostró que los neutrófilos incrementan la expresión de Mdm2 (ubiquitina ligasa que degrada p53), disminuyendo p53 y caspasa-2 (*Nakamura y col., 2010*). Se observó que la inflamación afecta la vía mediada por p53 y caspasa-2, no así la vía intrínseca de la apoptosis. Los hallazgos del presente trabajo permiten suponer que el ANF podría contribuir a aumentar la muerte por apoptosis en la pancreatitis aguda, estimulando la vía Mdm2/p53/caspasa-2 de manera directa y/o indirecta, a través de la disminución de la infiltración de neutrófilos en el páncreas.

Los hallazgos bioquímicos discutidos precedentemente sugieren claramente que el ANF tendría un efecto beneficioso en las fases tempranas de la pancreatitis aguda ya que atenúa la respuesta inflamatoria y estimula la apoptosis. Se evaluó si estas observaciones se correlacionaban con modificaciones a nivel de la ultraestructura del páncreas exocrino en los distintos grupos experimentales.

El modelo animal de pancreatitis aguda utilizado en este estudio generado por administración repetida de ceruleína, provoca pancreatitis edematosa que se caracteriza

histológicamente por la presencia de edema intersticial, infiltración neutrofílica, y vacuolización de la célula acinar. Entre las alteraciones ultraestructurales se identifican el *swelling* y daño de las crestas mitocondriales, el *swelling*, dilatación y degranulación del RE rugoso y la presencia de vacuolas con contenido citoplasmático (Gül y col., 2009). La apoptosis se manifiesta por condensación de la cromatina con localización perinuclear y formación de cuerpos apoptóticos (Bhatia y col., 1998). Los animales controles mostraron una morfología conservada del páncreas mientras que los animales con pancreatitis aguda presentaron las alteraciones ultraestructurales distintivas de la patología acorde a lo descrito en la bibliografía (Sjöstrand y Hanzon, 1954; Brackett y col., 1983; Watanabe y col., 1984; Gül y col., 2009). Se confirmó que la secretina agravó la pancreatitis aguda tal como había sido sugerido en estudios previos (Ventimiglia y col., 2015). Se observó pérdida de la arquitectura celular, mayor edematización, aumento no solo del número de vacuolas sino también del tamaño de las mismas, daño vascular, gránulos de zimógeno distribuidos en todo el citoplasma y una mayor presencia de cuerpos mielínicos, alteraciones morfológicas que reflejan agravamiento del daño y necrosis celular. Se incrementó la magnitud de *swelling* mitocondrial lo que implica alteraciones a nivel de la producción de energía, así como también el *swelling* del RE acompañado de la pérdida de ribosomas, lo que refleja grave alteración del aparato de síntesis de proteínas. Asimismo, se observó pérdida de las divisiones celulares y las uniones estrechas entre las células acinares. Este hallazgo junto con la presencia de gránulos de zimógeno dispersados en el citoplasma entraña una grave alteración fisiológica, ya que implica que el acino deja de comportarse como unidad funcional y se favorece la secreción baso-lateral, uno de los principales cambios de la fisiología de la célula acinar en la pancreatitis aguda (Gorelick y Thrower, 2009). Si bien la secretina disminuyó la activación de NF- κ B y redujo otros parámetros inflamatorios, se había demostrado previamente que incrementa la activación del tripsinógeno y favorece la necrosis. La sumatoria de los distintos efectos de la secretina en la pancreatitis aguda da por resultado un claro agravamiento de la patología tal como lo muestran las alteraciones a

nivel de la ultraestructura del páncreas. No obstante, distintos estudios muestran que la administración de la hormona a animales con pancreatitis aguda mejora el cuadro fisiopatológico ya que al estimular la secreción pancreática “barrería” las enzimas activadas del páncreas (*Renner y col., 1983; 1986; Niederau y col., 1985; Chaudbury y col., 2005*). Sin embargo, estos estudios no se oponen a hallazgos previos de nuestro laboratorio ni a los aquí reportados, ya que la secretina tendría un efecto dual dependiendo de la fase de la pancreatitis aguda. Niveles incrementados de secretina al inicio de la patología agravan claramente el desarrollo de la enfermedad, mientras que una vez establecida la pancreatitis la administración de la hormona ayudaría a limitar el daño celular al remover las enzimas activadas.

Por el contrario, el ANF mostró un claro efecto beneficioso reflejado en la ultraestructura del páncreas, consistente con los hallazgos a nivel de la respuesta inflamatoria y la apoptosis. Se observó una citoarquitectura más conservada, sin pérdida de las uniones estrechas, mitocondrias normales, menor edematización, vacuolización y necrosis, así como también ausencia de cuerpos mielínicos. Si bien se observó *swelling* de RE, la proporción fue menor que en el grupo tratado con ceruleína en presencia o ausencia de secretina. La reducción de áreas de necrosis se correlacionó con la presencia de zonas de retracción celular y un mayor número de núcleos con cromatina condensada en la zona perinuclear, lo que refleja un mayor grado de apoptosis, coincidente con los hallazgos bioquímicos. Los animales con pancreatitis aguda pre-tratados con ANF y secretina mostraron alteraciones de la ultraestructura que podrían definirse como intermedias entre lo observado en los animales tratados con secretina y los que recibieron ANF.

El ANF atenúa el desarrollo de la pancreatitis aguda, siendo los aspectos más relevantes a nivel de la ultraestructura, una morfología y polaridad más conservada, menor necrosis y mayor apoptosis. El aumento de la densidad gránulos de zimógeno orientados hacia la zona apical y la conservación de las uniones estrechas sugieren una mejora en la función secretora de la célula acinar. Asimismo, las observaciones a nivel del RE, como presencia de ribosomas y menor grado

de *swelling* son indicativos de una mejora en el aparato de síntesis de proteínas. Las observaciones ultraestructurales demuestran un papel protector del ANF en los estadios tempranos de la pancreatitis aguda. Los cambios morfológicos se acompañaron de modificaciones en parámetros bioquímicos, traducidos en una reducción de la respuesta inflamatoria y una estimulación de la apoptosis.

El ANF es un regulador de la fisiología del páncreas exocrino. A través de la estimulación de los receptores NPR-C acoplados a PLC/PKC se comporta como secretagogo estimulando tanto la fracción acuosa como proteica del jugo pancreático, interacciona con las principales hormonas reguladoras de la funcionalidad del páncreas, secretina y CCK y regula los niveles intracelulares de AMPc estimulando su extrusión a través de MRP-4 reduciendo la sensibilidad de los gránulos de zimógeno (*Sabbatini y col., 2003; 2007a; 2007b; Rodríguez y col., 2011*). Asimismo, reduce la activación del tripsinógeno, lo que sumando a los hallazgos del presente estudio reflejan claramente su papel beneficioso en la pancreatitis aguda. En virtud a lo expuesto surgió la pregunta acerca de cuál era la fuente de ANF responsable de los efectos observados tanto a nivel fisiológico como fisiopatológico. El atrio cardíaco es la principal fuente de ANF, si bien el péptido originado en el atrio no sería responsable ya que los estímulos que promueven su secreción no guardan relación con la fisiología y/o fisiopatología del páncreas. Existen fuentes extracardíacas de ANF como el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso central y las glándulas salivales, donde el péptido actuaría de manera autocrina y/o paracrina al ser liberado ante estímulos no claramente identificados. Por lo expuesto y teniendo en consideración la existencia de fuentes de ANF en el sistema digestivo se investigó la posible síntesis del péptido en el páncreas exocrino. Existían indicios surgidos de trabajos previos realizados en la década del 80 que mostraban la presencia de ANF inmunoreactivo en el páncreas (*Chabot y col., 1987; 1988; Adegate y col., 1996*). No obstante, se creía que el ANF provenía de la circulación y que era internalizado para su degradación, aunque existía la posibilidad de que fuera de origen pancreático, lo que no fue

confirmado mediante otros estudios. En este trabajo se muestra que el ANF es sintetizado en el páncreas ya que se detectó su ARNm, aunque su abundancia sería mucho menor que en el atrio. Los ensayos de Western Blot y microscopía de inmunofluorescencia confirmaron la expresión del péptido maduro en el páncreas exocrino y los estudios de inmunomarcación con oro permitieron observar la localización de ANF en el RE, gránulos de zimógeno y mitocondrias de las células acinares pancreáticas. Estos hallazgos sustentan de que el ANF es sintetizado en el páncreas y que es almacenado en los gránulos de zimógeno, que al igual que los gránulos atriales, presentan un ambiente ligeramente ácido. La presencia de ANF en los gránulos de zimógeno sugiere que sería secretado en el jugo pancreático hacia el duodeno donde podría actuar sobre los enterocitos o bien regresar al páncreas a través de la circulación y actuar sobre los receptores presentes en la célula acinar. Asimismo, cabe la posibilidad de que el ANF se sintetice de manera constitutiva y se libere al medio extracelular para actuar de manera paracrina y/o autocrina. No obstante, son necesarios estudios adicionales exhaustivos a fin de dilucidar de ocurre una vez que el ANF es sintetizado en la célula acinar.

En el presente trabajo se observó que, en la pancreatitis aguda, la expresión de ANF se incrementó significativamente. Si bien, células de la inmunidad innata como los macrófagos, sintetizan y secretan ANF, los ensayos de inmunofluorescencia sustentan que el aumento en la expresión de ANF en condiciones de pancreatitis aguda sería a nivel de las células acinares (*De Vito, 2014*). El aumento de expresión de ANF en la patología podría constituir una respuesta de la célula acinar a fin de limitar el daño gatillado por la activación *in situ* del tripsinógeno y la respuesta inflamatoria.

En estudios previos se demostró que el páncreas exocrino expresa los tres receptores de péptidos natriuréticos: NPR-A, NPR-B y NPR-C (*Sabbatini y col., 2007b*). El presente trabajo muestra que el receptor NPR-C, que media los efectos del ANF en el páncreas se localiza a nivel basolateral de las células acinares, si bien su expresión no se modifica en la pancreatitis aguda. La

localización del receptor NPR-C es compatible con la localización de los receptores de otros secretagogos pancreáticos como los receptores de secretina, CCK1, CCK2, y VPAC, entre otros.

La *figura 58* resume los principales hallazgos detallados en este trabajo en relación a los efectos del ANF sobre la respuesta inflamatoria y la muerte celular en los estadios tempranos de la pancreatitis aguda.

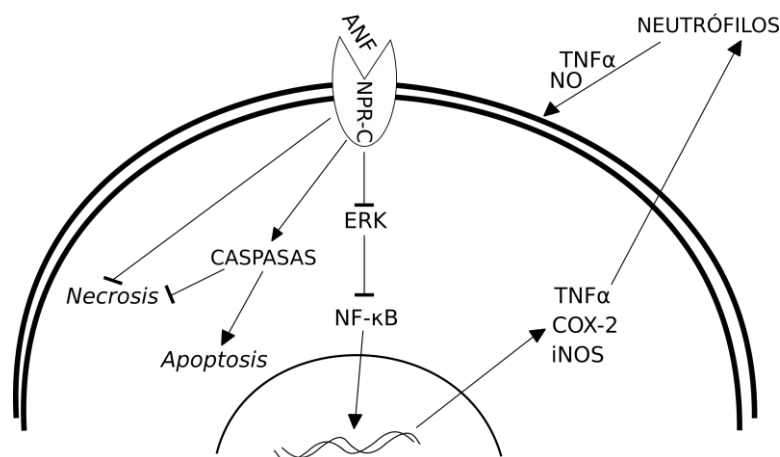


Figura 58: Principales efectos del ANF sobre la respuesta inflamatoria y muerte celular en la pancreatitis aguda. El ANF a través del receptor NPR-c estimula la apoptosis e inhibe la respuesta inflamatoria al inhibir la activación de NF-Kb y ERK 1/2 llevando a la reducción de TNF- α y la expresión de iNOS y COX2. Asimismo, disminuye la infiltración de neutrófilos en el páncreas.

Los estudios realizados en este trabajo de tesis permiten concluir que el páncreas exocrino de rata constituye una fuente extra-cardíaca de ANF y que en la pancreatitis aguda la expresión del péptido se incrementa y además ejerce efectos protectores en las fases iniciales de la patología atenuando la respuesta inflamatoria e incrementando la apoptosis, lo que reduce significativamente la severidad del daño celular.

Los estudios mostrados en esta tesis sumados a los hallazgos previos de nuestro laboratorio sustentan que en presencia de ANF, la pancreatitis aguda se atenúa significativamente ya que disminuye la activación del tripsinógeno y la respuesta inflamatoria y estimula la apoptosis. No obstante, mas allá de conocerse la etiología, una vez disparada la patología, su tratamiento es simplemente paliativo, apunta a reducir la actividad de la glándula y la sintomatología. El curso incierto de la enfermedad implica una preocupación médica, ya que, si bien en la mayoría de los pacientes el curso es benigno y autolimitado, en un grupo de individuos evoluciona a una forma severa con importante compromiso sistémico que entraña elevada mortalidad provocada por fallo multiorgánico. En un modelo de pancreatitis no severa el ANF mostró efectos beneficiosos al proteger al páncreas del daño celular por lo que, dado el curso incierto de la patología en humanos, podría ser eficaz su administración o la de análogos no peptídicos para prevenir un posible agravamiento del cuadro fisiopatológico. Asimismo, podría tener utilidad su administración previa a la realización de una colangiopancreatografía retrógrada endoscópica, ya que esta práctica médica, empleada para el estudio de las vías biliares y pancreáticas, se asocia al desarrollo de pancreatitis aguda. La administración de inhibidores de proteasas en pacientes con pancreatitis aguda no es efectiva para el tratamiento de la patología (*Schmid y col., 1996*). Sin embargo, su administración previa a la realización de la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica, reduce significativamente la incidencia de la pancreatitis aguda (*Cavallini y col., 1996*).

Los modelos animales y la evidencia clínica muestran certezas para atenuar la pancreatitis aguda y mejorar su pronóstico. En este sentido, es necesaria la reducción de la activación de proteasas y de NF- κ B así como también la estimulación de la apoptosis para reducir la respuesta inflamatoria y el daño tisular (*Bhatia, 2004; Connor y Neoptolemos, 2004; Sah y Saluja, 2011; Sah y col., 2013*). En este contexto, los resultados mostrados en la presente tesis plantean un horizonte alentador, si bien numerosos estudios son necesario a fin de comprobar su eficacia a nivel clínico.

Bibliografia

- Adeghate, E., Ember, Z., Donath, T., Pallot, D.J., & Singh, J. Immunohistochemical identification and effects of atrial natriuretic peptide, pancreastatin, leucin-enkephalin and galanin in the porcine pancreas. *Peptides*, 17: 503-509, 1996.
- Aho H.J., Nevalainen T.J., Aho A.J. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection. *Eur Surg Res.*, 15(1):28-36, 1983.
- Aho H.J., Nevalainen T.J., Lindberg R.L., Aho A.J. Experimental pancreatitis in the rat. The role of phospholipase A in sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*, 15(8):1027-31, 1980.
- Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.*, 75:639-653, 2004.
- Albadawi, H., Crawford, R.S., Atkins, M.D. & Watkins, M.T. Role of poly (ADP-ribose) polymerase during vascular reconstruction. *Vascular*, 362-365, 2006.
- Algül, H., Tando, Y., Schneider, G., Weidenbach, H., Adler, G. & Schmid, R.M. Acute experimental pancreatitis and NF-kappaB/Rel activation. *Pancreatology*, 2:503-509, 2002.
- Al-Mufti, R.A., Williamson, R.C.N. & Mathie RT. Increased nitric oxide activity in a rat model of acute pancreatitis. *Gut*, 43: 564-70, 1998.
- Anagnostides, A., Chadwick, V.S., Selden, A.C. & Maton, P.N. Sham feeding and pancreatic secretion. Evidence for direct vagal stimulation of enzyme output. *Gastroenterology*, 87: 109-114, 1984.
- Anand-Srivastava, M.B. Natriuretic peptide receptor C signaling and regulation. *Peptides*, 26: 1044-1059, 2005.
- Anand-Srivastava, M.B., Sehl, P.D. & Lowe DG. Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor-C inhibits adenylyl cyclase: involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *J. Biol. Chem.*, 271:19324-19329, 1996.
- Anand-Srivastava, M.B. & Trachte, G.J. Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol. Rev.*, 45: 455-497, 1993.
- Ang, A.D., Adhikari, S., Ng, S.W. & Bhatia, M. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitric oxide production in acute pancreatitis and associated lung injury. *Pancreatology*, 9:150-9, 2009.
- Aoki, Y. & Kao, P.N. Cyclosporin A-sensitive calcium signaling represses NFkappaB activation in human bronchial epithelial cells and enhances NFkappaB activation in Jurkat T-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234: 424-431, 1997.
- Aoyama, A., Chen, F., Fujinaga, T., Sato, A., Tsuruyama, T., Zhang, J., Shoji, T., Sakai, H.,

- Nakamura, T., Date, H., Wada, H. & Bando, T. Post-ischemic infusion of atrial natriuretic peptide attenuates warm ischemia-reperfusion injury in rat lung. *Heart Lung Transplant*, 28(6):628-34, 2009.
- Apte, M.V., Haber, P.S., Norton, I.D. & Wilson, J.S. Alcohol and the pancreas. *Addiction Biol.*, 137-50, 1998.
 - Bae, J.H., Shim, J.H. & Cho, Y.S. Chemical regulation of signaling pathways to programmed necrosis. *Arch Pharm Res.*, 689-697, 2014.
 - Bakhle, Y.S. & Botting, R.M. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. *Mediators of Inflammation*, 305-323, 1996.
 - Baldwin, A.S. Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.*, 14: 649-683, 1996
 - Barnes, P.J. & Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.*, 336: 1066-1071, 1997.
 - Barros, L.F., Hermosilla, T. & Castro, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol A.*, 130: 401-409, 2001.
 - Bassi, C., Butturini, G., Falconi, M., Salvia, R., Frigerio, I. & Pederzoli, P. Outcome of open necrosectomy in acute pancreatitis. *Pancreatology* 3, 128-132, 2003.
 - Bhatia, M., Brady, M., Shokuhi, S., Christmas, S., Neoptolemos, J.P. & Slavin, J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J. Pathol.*, 190: 117-125, 2000.
 - Bhatia, M., Slavin, J., Cao, Y., Basbaum, A.I., Neoptolemos, J.P. Preprotachykinin-A gene deletion protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 284: G830-G836, 2003.
 - Bhatia, M., Wallig, M.A., Hofbauer, B., Lee, H.S., Frossard, J.L., Steer, M.L. & Saluja, A.K. Induction of apoptosis in pancreatic acinar cells reduces the severity of acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun*, 476-483, 1998.
 - Bhatia, M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 286: G189-G196, 2004.
 - Bianciotti, L.G., Eleverdin, J.C., Vatta, M.S. & Fernández, B.E. Atrial natriuretic factor modifies the composition of induced-salivary secretion in the rat. *Regul. Pept.*, 65:139-143, 1996.
 - Bianciotti, L.G., Elverdin, J.C., Vatta, M.S., Colatrella, C. & Fernandez, B.E. Atrial natriuretic factor enhances induced salivary secretion in the rat. *Regul. Pept.*, 49: 195-202, 1994.
 - Bianciotti, L.G., Vatta, M.S., Elverdin, J.C., di Carlo, M.B., Negri, G. & Fernandez, B.E. Atrial natriuretic factor induced amylase output in the rat parotid gland appears to be mediated

by the inositol phosphate pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247: 123-128, 1998

- Bianciotti, L.G., Vatta, M.S., Vecina, C., Trippodi, V., Sabbatini, M.E. & Fernández, B.E. Centrally applied atrial natriuretic factor diminishes bile secretion in the rat. *Regul. Pept.*, 102:127-133, 2001.
- Biselli, R., Farrace, S., De Simone, C. & Fattorossi, A. Potentiation of human polymorphonuclear leukocyte activation by atrial natriuretic peptide. Inhibitory effects of carnitine congeners. *Inflammation*, 33–42, 1996.
- Brackett, K.A., Crocket, A. & Joffe, S.N. Ultrastructure of early development of acute pancreatitis in the rat. *Dig. Dis. Sci.*, 28: 74-84, 1983.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
- Brady, M., Bhatia, M., Christmas, S., Boyd, M.T., Neoptolemos, J.P. & Slavin, J. Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis. *Pancreas*, 25: 260-269, 2002.
- Brandt, R.R., Heublein, D.M., Aarhus, L.L., Lewicki, J.A. & Burnett, J.C. Jr. Role of natriuretic peptide clearance receptor in in vivo control of C-type natriuretic peptide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 195: 269:H326-H331, 1995.
- Brenner, B.M., Ballermann, B.J., Gunning, M.E. & Zeidel, M.L. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol. Rev.*, 70: 665-699, 1990.
- Bruneau, B.G. & de Bold, A.J. Selective changes in natriuretic peptide and early response gene expression in isolated rat atria following stimulation by stretch or endothelin-1. *Cardiovasc. Res.*, 28:1519-1525, 1994.
- Buja, L.M., Eigenbrodt, M.L. & Eigenbrodt, E.H. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med.*, 117: 1208-1214, 1993.
- Cantin, M., Gutkowska, J., Thibault, G., Milne, R.W., Ledoux, S., MinLi, S., Chapeau, C., Garcia, R., Hamet, P. & Genest, J. Immunocytochemical localization of atrial natriuretic factor in the heart and salivary glands. *Histochemistry*, 80:113-127, 1984.
- Cargnello, M. & Roux, P.P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 75: 50-83, 2011.
- Carini, R., Autelli, R., Bellomo, G., Dianzani, M.U. & Albano, E. Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxins. *Biochem Biophys Res Commun.*, 206: 180-185, 1995.
- Cavallini, G., Tittobello, A., Frulloni, L., Masci, E., Mariana, A., & Di Francesco, V. Gabexate for the prevention of pancreatic damage related to endoscopic retrograde cholangiopancreatography. Gabexate in digestive endoscopy—Italian group. *N Engl J Med*, 919–923, 1996.

-
- Cerra, M.C. Cardiac distribution of the binding sites for natriuretic peptides in vertebrates. *Cardioscience*, 5:215-24, 1994.
 - Chabot, J.G., Morel, G., Belles-Isles, M., Jeandel, L. & Heisler, S. ANF and exocrine pancreas: ultrastructural autoradiographic localization in acinar cells. *Am. J. Physiol.*, 254: E301-E309, 1988.
 - Chabot, J.G., Morel, G., Kopelman, H., Belles-Isles, M. & Heisler, S. Atrial natriuretic factor and exocrine pancreas: autoradiographic localization of binding sites and ultrastructural evidence for internalization of endogenous ANF. *Pancreas*, 2: 404-413, 1987.
 - Chan, Y.C. & Leung, P.S. Acute pancreatitis: Animal models and recent advances in basic research. *Pancreas*, 34: 1-14, 2007.
 - Chandra, R. & Liddle, R.A. Regulation of pancreatic secretion. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. 2015 [DOI: 10.3998/panc.2015.38].
 - Chaitanya, G.V., Steven, A.J. & Babu, P.P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.*, 8:31, 2010.
 - Chaudhuri, A., Kolodecik, T.R. & Gorelick, F.S. Effects of increased intracellular cAMP on carbachol stimulated zymogen activation, secretion and injury in the pancreatic acinar cell. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 288: G235-243, 2005.
 - Chinetti, G., Fruchart, J.C. & Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: from basic science to clinical applications. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, 41-45, 2003.
 - Cohen, D., Koh, G.Y., Nikonova, L.N., Porter, J.G., Maack, T. Molecular determinants of the clearance function of type C receptors of natriuretic peptides. *J. Biol. Chem.*, 271:9863-9869, 1996.
 - Connor, S. & Neoptolemos J.P. Surgery for pancreatic necrosis: "whom, when and what". *World J Gastroenterol*, 1697-8, 2004.
 - Conze, D., Krahl, T., Kennedy, N., Weiss, L., Lumsden, J., Hess, P., Flavell, R.A., Le Gros, G., Davis, R.J. & Rincón, M. c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in CD8(+) T cell activation. *J. Exp. Med.*, 195: 811-823, 2002.
 - Cruz-Santamaría, D.M., Taxonera, C. & Giner, M. Update on pathogenesis and clinical management of acute pancreatitis. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.*, 3 : 60-70, 2012.
 - Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., Centorrino, T., Ciccolo, A., Van de Loo, F.A., Britti, D., Caputi, A.P. & Thiemermann, C. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice exhibit resistance to the acute pancreatitis induced by cerulein. *Shock*, 17(5):416-22, 2002.

-
- Chawla, A., Schwarz, E.J., Dimaculangan, D.D. & Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*, 798-800, 1994.
 - Dabrowski, A., Grady, T., Logsdon, C.D. & Williams, J.A. Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, 271: 5686-5690, 1996.
 - Dabrowski, A., Konturek, S.I. & Konturek, J.W. Role of oxidative stress in the pathogenesis of cerulein-induced acute pancreatitis. *Eur. J. Pharmacol.*, 377:1-11, 1999.
 - Dagnino, L., Drouin, J. & Nemer, M. Differential expression of natriuretic peptide genes in cardiac and extracardiac tissues. *Mol. Endocrinol.*, 5:1292-1300, 1991.
 - Dantzer, F., de La Rubia, G., Ménissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G. & Schreiber, V. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*, 7559-7569, 2000.
 - Dawra, R., Sah, R.P., Dudeja, V., Rishi, L., Talukdar, R., Garg, P. & Saluja, A.K. Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 141: 2210-2217, 2011.
 - de Bold, A.J., Borenstein, H.B., Veress, A.T. & Sonnenberg, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 28: 89-94, 1981.
 - de Bold, A.J., Bruneau, B.G. & Kuroski de Bold, M.L. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc. Res.*, 31: 7-18, 1996.
 - de Bold, A.J. & Flynn, T.G. Cardionatrin I - a novel heart peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Life Sci.*, 33: 297-302, 1983.
 - de Bold, A.J. (1985). Atrial natriuretic factor A hormone produced by the heart. *Science*, 230:767-770, 1985.
 - De Giorgio, R., Sternini, C., Brecha, N.C., Widdison, A.L., Karanjia, N.D., Reber, H.A. & Go, V.L.W. Pattern of innervation of vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y, and gastrin-releasing peptide immunoreactive nerves in the feline pancreas. *Pancreas*, 7: 376-384, 1992.
 - De Vito, P. Atrial natriuretic peptide: an old hormone or a new cytokine? *Peptides*, 58:108-116, 2014.
 - Diaz, A., Chepenik, K.P., Korn, J.H., Reginato, A.M. & Jimenez, S.A. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. *Exp. Cell. Res.*, 241: 222-229, 1998.

-
- Dineva, J., Vangelov, I., Nikolov, G., Gulenova, D. & Ivanova, M. Atrial natriuretic peptide is an antiapoptotic factor for human granulosa luteinized cells with impact on the results of COH/IVF in women undergoing IVF program. *J. Obst. Gynaecol. Res.*, 37: 511-519, 2011.
 - Dolai, S., Liang, T., Cosen-Binker, L.I., Lam, P. & Gaisano, H.Y. Regulation of physiologic and pathologic exocytosis in pancreatic acinar cells. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base. Version 1.0, July 27, 2012 [DOI: 10.3998/panc.2012.12]*.
 - Duan, R.D. & Williams, J.A. Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol.*, 267: G401-G408, 1994.
 - Du Bois, R.N., Awad, J., Morrow, J., Roberts, L.J. & Bishop, P.R. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor α and phorbol ester. *J Clin Invest* 93:493-498, 1994.
 - Dufour, M.C. & Adamson, M.D. The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas*, 27: 286-290, 2003.
 - Earnshaw, W.C., Martins, L.M. & Kaufmann, S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68,383-424, 1999.
 - Edwards, B.S., Zimmerman, R.S., Schwab, T.R., Heublein, D.M. & Burnett, Jr. J.C. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ. Res.*, 62:191-195, 1988.
 - Erdos, E.G. & Skidgel, R.A. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J.*, 3:145-151, 1989.
 - Ethridge, R.T., Chung, D.H., Slogoff, M., Ehlers, R.A., Hellmich, M.R., Rajaraman, S., Saito, H., Uchida, T. & Evers, B.M. Cyclooxygenase-2 gene disruption attenuates the severity of acute pancreatitis and pancreatitis associated lung injury. *Gastroenterology*, 123: 1311-1322, 2002.
 - Fava, L.L., Bock, F.J., Geley, S. & Villunger, A. Caspase-2 at a glance. *J Cell Sci.*, 125:5911-5915, 2012.
 - Fernández, B.E., Bianciotti, L.G., Vatta, M.S., Dominguez, A.E. & Vescina, C. Atrial natriuretic factor modifies bile flow and composition in the rat. *Regul. Pept.*, 43:177-184, 1993.
 - Fischer, U., Janicke, R.U. & Schulze-Osthoff, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 76-100, 2003.
 - Fiscus, R.R., Tu, A.W.K. & Chew, S. Natriuretic peptides inhibit apoptosis and prolong the survival of serum-deprived PC12 cells. *Neuroreport*, 12: 185-189, 2001.
 - Flynn, T.G., de Bold, M.L. & de Bold, A.J. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem.Biophys. Res.Commun.*, 117 859-865,

1983.

- Foitzik, T., Hotz, B., Wittig, F. & Buhr H.J. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) reduces prostaglandin E2 production and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *Hepatology* 50: 1159-1162, 2003.
- Fowkes, R.C. & McArdle, C.A. C-type natriuretic peptide: an important neuroendocrine regulator? *Trends Endocrinol. Metab.*, 11: 333-338, 2000.
- Frossard, J.L., Steer, M.L. & Pastor, C.M. Acute pancreatitis. *Lancet*, 371:143-152, 2008.
- Fuller, F., Porter, J.G., Arfsten, A.E., Miller, J., Schilling, J.W., Scarborough, R.M., Lewicki, J.A. & Schenk, D.B. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J. Biol. Chem.*, 263: 9395-9401, 1988.
- Gao, J., Liu, Q., Xu, Y., Gong, X., Zhang, R., Zhou, C., Su, Z., Jin, J., Shi, H., Shi, J. & Hou, Y. PPAR α induces cell apoptosis by destructing Bcl2. *Oncotarget*, 29: 44635-44642, 2015.
- Garbers, D.L. The guanylyl cyclase receptors. *Methods*, 19: 477-484, 1999.
- Gardner, D.G., Deschepper, C.F., Ganong, W.F., Hane, S., Fiddes, J., Baxter, J.D. & Lewicki, J. Extra atrial expression of the gene for atrial natriuretic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 6697-6701, 1986.
- Gardner, D.G., Vlasuk, G.P., Baxter, J.D., Fiddes, J.C. & Lewicki, J.A. Identification of atrial natriuretic factor gene transcripts in the central nervous system of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 84: 2175-2179, 1987.
- Geng, Y. & Lotz, M. Increased intracellular Ca²⁺ selectively suppresses IL-1-induced NO production by reducing iNOS mRNA stability. *J. Cell Biol.*, 129: 1651-1657, 1995.
- Gerwig, T., Meibner, H., Bilzer, M., Kiemer, A.K., Arnholdt, H., Vollmar, A.M. & Gerbes, A.L. Atrial natriuretic peptide preconditioning protects against hepatic preservation injury by attenuating necrotic and apoptotic cell death. *J. Hepatol.*, 39: 341-348, 2003.
- Gorelick, F., Pandol, S.J. & Topazian M. Pancreatic physiology, pathophysiology, acute and chronic pancreatitis. *Gastrointestinal Teaching Project, American Gastroenterologic Association*. 2003.
- Gorelick, F.S. & Jamienson, J.D. The pancreatic acinar cell: Structure-function relationship. En: *Physiology of the gastrointestinal tract, Second edition*. Ed: Johnson LR. Raven Press, New York, pp 1089-1109, 1987.
- Gorelick, F.S. & Thrower, E. The Acinar Cell and Early Pancreatitis Responses. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*, 7: S10–S14, 2009.
- Gower, W.R. Jr, Dietz, J.R., Mc Cuen, R.W., Fabri, P.J., Lerner, E.A. & Schubert, M.L. Regulation of atrial natriuretic secretion by cholinergic and PACAP neurons in the gastric antrum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 284: G68-G74, 2003.

-
- Gower, W.R. Jr., Dietz, J.R., Vesely, D.L., Finley, C.L., Skolnick, K.A., Fabri, P.J., Cooper, D.R. & Chalfant, C.E. Atrial natriuretic peptide gene expression in the rat gastrointestinal tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202: 562-570, 1994.
 - Gower, W.R. Jr., Salhab, K.F., Foulis, W.L., Pillai, N., Bundy, J.R., Vesely, D.L., Fabri PJ. & Dietz, J.R. Regulation of atrial natriuretic peptide gene expression in gastric antrum by fasting. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 278: R770-R780, 2000.
 - Gower, W.R., Dietz, J.R., Vessely, D.L., Finley, C.L., Scholnick, K.A., Fabri, P.J., Cooper, D.R. & Chalfant, E. Atrial natriuretic peptide gene expression in the gastrointestinal tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202: 562-570, 1994.
 - Grady, T., Dabrowski, A., Williams, J.A. & Logsdon, C.D. Stress activated protein kinase activation is the earliest direct correlate to the induction of secretagogue-induced pancreatitis in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227: 1-7, 1996.
 - Gray, M.A., Greenwell, J.R. & Argent, B.E. Secretin-Regulated Chloride Channel on the Apical Plasma Membrane of Pancreatic Duct Cells. *J. Memb. Biol.* 105: 131-142, 1988.
 - Grutzner, U., Keller, M., Bach, M., Kiemer, A.K., Meissner, H., Bilzer, M., Zahler S., Gerbes AL. & Vollmar, A.M. PI 3-kinase pathway is responsible for antiapoptotic effects of atrial natriuretic peptide in rat liver transplantation. *World J. Gastroenterol.*, 12:1049-1055, 2006.
 - Guan, Z., Buckman, S.Y., Miller, B.W., Springer, L.D. & Morrison, A.R. Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. *J. Biol. Chem.*; 273: 28670-28676, 1998.
 - Gukovskaya, A.S. & Pandol, S.J. *Cell death pathways in pancreatitis and pancreatic cancer. Pancreatology*, 4(6):567-86, 2004.
 - Gukovskaya, A.S., Gukovsky, I., Jung, Y., Mouria, M. & Pandol, S.J. Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. Roles in cell injury processes of pancreatitis. *J. Biol. Chem.*, 277: 22595-22604, 2002.
 - Gukovskaya, A.S., Gukovsky, I., Zaninovic, V., Song, M., Sandoval, D., Gukovsky S. & Pandol, S.J. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J. Clin. Invest.*, 100: 1853-1862, 1997.
 - Gukovskaya, A.S., Perkins, P., Zaninovic, V., Sandoval, D., Rutherford, R., Fitzsimmons, T., Pandol, S.J. & Poucell-Hatton, S. Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat. *Gastroenterology*, 110(3):875-84, 1996.
 - Gukovsky, I., Gukovskaya, A.S., Blinman, T.A., Zaninovic, V. & Pandol, S.J. Early NF-kB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol.*, 275: G1402-G1414, 1998.
 - Gukovsky, I., Reyes, C.N., Vaquero, E.C., Gukovskaya, A.S. & Pandol SJ. Curcumin

- ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 284: G85-95, 2003.
- Gül, M., Eşrefoğlu, M., Oztürk, F., Ateş, B. & Otlu, A. The beneficial effects of pentoxifylline on caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci*, 555-563, 2009.
 - Gutkowska, J., Nemer, M., Sole, M.J., Drouin, J. & Sirois, P. Lung is an important source of atrial natriuretic factor in experimental cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.*, 83:1500-1504, 1989.
 - Halangk, W., Lerch, M.M., Brandt-Nedelev, B., Roth, W., Ruthenbueger, M., Reinheckel, T., Domschke, W., Lippert, H., Peters, C. & Deussing, J. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest.*, 106:773-781, 2000.
 - Han, B., Baoan, J. & Logsdon, C.D. CCK independently activates intracellular trypsinogen and NF- κ B in rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 49: C465–C472, 2001.
 - Hartwig, W., Jimenez, R.E., Werner, J., Lewandrowski, K.B., Warshaw, A.L. & Fernández-del Castillo, C. Interstitial trypsinogen release and its relevance to the transformation of mild into necrotizing pancreatitis in rats. *Gastroenterology*, 117:717-725, 1999.
 - Hehlgans, T. & Pfeffer, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/ tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115:1-20, 2005.
 - Heisler, S., Kopelman, H., Chabot, J.G. & Morel, G. Atrial natriuretic factor and exocrine pancreas: effects on the secretory process. *Pancreas*, 2: 243-251, 1987.
 - Heller, R.A. & Krönke, M. Tumor necrosis factor receptor mediated signaling pathways. *J. Cell Biol.*, 126: 5-9, 1994.
 - Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805):770-6, 2000.
 - Hietaranta, A.J., Saluja, A.K., Bhagat, L., Singh, V.P., Song, A.M. & Steer, M.L. Relationship between NF- κ B and trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 280:388-395, 2001
 - Holliday, L.S., Dean, A.D., Greenwald, J.E. & Glucks, S.L. C-type natriuretic peptide increases bone resorption in 1,25-dihydroxyvitamin D₃-stimulated mouse bone marrow cultures. *J. Biol. Chem.*, 270: 18983-18989, 1995.
 - Holmes, S.J., Espiner, E.A., Richards, A.M., Yandle, T.G. & Frampton, C. Renal, endocrine, and hemodynamic effects of human brain natriuretic peptide in normal man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76: 91-96, 1993.
 - Holst, J.J., Fahrenkrug, J., Knuhtsen, S., Jensen, S.L., Poulsen, S.S. & Nielsen, O.V. Vasoactive intestinal peptide (VIP) in the pig pancreas: role of VIPergic nerves in control of fluid and bicarbonate secretion. *Reg. Peptides*, 8: 245-259, 1984.
 - Holtz, B.J., Lodewyk, K.B., Sebolt-Leopold, J.S., Ernst, S.A. & Williams, J.A. ERK activation is required for CCK-mediated pancreatic adaptive growth in mice. *Am. J. Physiol.*

Gastrointest. Liver Physiol., 307: G700-G710, 2014.

- Horvath, J., Ertl, T. & Schally, A.V. Effect of atrial natriuretic peptide on gonadotropin release in superfused rat pituitary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 3444-3446, 1986.
- Hruban, R.H., Pitman, M.B. & Klimstra, D.S. AFIP Atlas of Tumor Pathology, Fourth Series, Fascicle Tumors of the pancreas. *American Registry of Pathology, Washington, DC in collaboration with the Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC*, 2007.
- Huang, H., Liu, Y., Daniluk, J., Gaiser, S., Chu, J., Wang, H., Li, Z., Logsdon, C. & Baoan, J.I. Activation of nuclear Factor- κ B in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice. *Gastroenterology*, 144: 202-210, 2013.
- Hughes, C.B., Grewal, H.P., Gaber, L.W., Kotb, M., El-din, A.B., Mann, L. & Gaber, A.O. Anti-TNF α therapy improves survival and ameliorates the pathophysiologic sequelae in acute pancreatitis in the rat. *Am. J. Surg.*, 171: 274-280, 1996.
- Hyun, J.J. & Lee, H.S. (2014). Experimental models of pancreatitis. *Clin Endosc.*, 47:212-216, 2014.
- Iimura, O., Kusano, E., Homma, S., Takeda, S., Ikeda, U., Shimada, K. & Asano, Y. Atrial Natriuretic Peptide Enhances IL-1 β -Stimulated Nitric Oxide Production in Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Kidney Blood Press. Res.*, 21: 36-41, 1998.
- Inagami, T., Tanaka, I., McKenzie, J.C., Nakamaru, M., Takayanagi, R., Imada, T., Pochet, R., Resibois, A., Naruse, M., Naruse, K. & Shibasaki T. Discovery of atrial natriuretic factor in the brain: its characterization and cardiovascular implication. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 9:75-85, 1989.
- Inoue, H., Tanabe, T. & Umesono, K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPAR γ . *J. Biol. Chem.*, 275: 28028-28032, 2000.
- Inoue, H., Yokoyama, C., Hara, S., Tone, Y. & Tanabe, T. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J. Biol. Chem.*, 270: 24965-24971, 1995.
- Insel, P.A., Zhang, L., Murray, F., Yokouchi, H. & Zambon, A.C. Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol.*, 277-287, 2012.
- Irrera, N., Bitto, A., Interdonato, M., Squadrito, F. & Altavilla, D. Evidence for a role of mitogen-activated protein kinases in the treatment of experimental acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.*, 20: 16535-16543, 2014.
- Janowski, M., Tremblay, J. & Gutkowska, J. Natriuretic peptide system in the rat submaxillary gland. *Regul. Pept.*, 62:53-61, 1996.
- Jiang, C., Ting, A.T. & Seed, B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391: 82-86, 1998.

-
- Joergensen, M.T., Brusgaard, K., Crüger, D.G., Gerdes, A.M. & Schaffalitzky de Muckadell, O.B. Genetic, epidemiological, and clinical aspects of hereditary pancreatitis: a population-based cohort study in Denmark. *Am. J. Gastroenterol.*, 105:1876-1883, 2010.
 - Jordan, M.L., Rominski, B., Jaquins-Gerstl, A., Geller, D. & Hoffman, R.A. Regulation of inducible nitric oxide production by intracellular calcium. *Surgery*, 118: 138-145, 1995.
 - Kaiser, A.M., Saluja, A.K., Sengupta, A., Saluja, M. & Steer, M.L. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol.*, 269, C1295–C1304, 1995.
 - Kangawa, K. & Matsuo, H. Purification and complete amino acid sequence of a-human atrial natriuretic polypeptide (a-hANP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 118: 131-139, 1984.
 - Karin, M. The NF-kappa B activation pathway: its regulation and role in inflammation and cell survival. *Cancer J. Sci. Am.*, 4: S92-S99, 1998.
 - Kasama, T., Miwa, Y., Isozaki, T., Odai, T., Adachi, M. & Kunkel, S.L. Neutrophil-derived cytokines : potential therapeutic targets in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 4: 273-279, 2005.
 - Kato, T., Muraski, J., Chen, Y., Tsujita, Y., Wall, J., Glembotski, C.C., Schaefer, E., Beckerle, M. & Sussman, M.A. Atrial natriuretic peptide promotes cardiomyocyte survival by cGMP dependent nuclear accumulation of zyxin and Akt. *J. Clin. Invest.*, 115: 2716-2730, 2005.
 - Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S. & Sugimoto, Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1851: 414-421, 2015.
 - Ke, B., Zhao, Z., Ye, X., Gao, Z., Manganiello, V., Wu, B. & Ye, J. Inactivation of NF-κB p65 (RelA) in Liver Improves Insulin Sensitivity and Inhibits cAMP/PKA Pathway. *Diabetes*. 64:3355-3362, 2015.
 - Kennedy, B.P., Marsden, J.J., Flynn, T.G., de Bold, A.J. & Davies, P.L. Isolation and nucleotide sequence of a cloned cardionatrin cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122: 1076-1082, 1984.
 - Kiemer, A.K., Hartung, T. & Vollmar, A.M. cGMP-mediated inhibition of TNF-alpha production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages. *J. Immunol.*, 165:175-181, 2000b.
 - Kiemer, A.K., Lehner, M.D., Hartung, T. & Vollmar, A.M. Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. *Endocrinology*, 143: 846-852, 2002.
 - Kiemer, A.K. & Vollmar, A.M. Autocrine regulation of the inducible nitric oxide synthase by Atrial Natriuretic Peptide in macrophages. *J. Biol. Chem.*, 273: 13 444-451, 1998.

-
- Kiemer, A.K. & Vollmar, A.M. Atrial Natriuretic Peptide inhibits nitric-oxide synthesis by reducing iNOS messenger RNA levels in mouse macrophages. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 355: 306-306, 1997.
 - Kiemer, A.K. & Vollmar, A.M. Induction of l-arginine transport is inhibited by ANP: a peptide hormone as novel regulator of iNOS substrate availability. *Mol. Pharmacol.*, 60: 421-426, 2001.
 - Kiemer, A.K., Vollmar, A.M., Bilzer, M., Gerwig, T. & Gerbes AL. Atrial natriuretic peptide reduces expression of TNF-alpha mRNA during reperfusion of the rat liver upon decreased activation of NF-kappaB and AP-1. *J. Hepatol.*, 33: 236-246, 2000a.
 - Kiemer, A.K., Hartung, T. & Vollmar, A.M. cGMP-mediated inhibition of TNF-alpha production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages. *J. Immunol.*, 165:175-181, 2000.
 - Kiemer, A.K., Vollmar, A.M., Bilzer, M., Gerwig, T. & Gerbes, A.L. Atrial natriuretic peptide reduces expression of TNF-alpha mRNA during reperfusion of the rat liver upon decreased activation of NF-kappaB and AP-1. *J Hepatol.*, 33: 236-246, 2000.
 - Kim, H. Inhibitory mechanism of lycopene on cytokine expression in experimental pancreatitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1229: 99-102, 2011.
 - Kimura, Y., Hirota, M., Okabe, A., Inoue, K., Kuwata, K., Ohmuraya, M. & Ogawa, M. Dynamic aspects of granulocyte activation in rat severe acute pancreatitis. *Pancreas*, 27:127-132, 2003.
 - Kingsnorth, A. & O'Reilly, D. Acute pancreatitis. *Br. Med. J.*, 332: 1072-1076, 2006.
 - Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 13:159-175, 2013.
 - Koller, K.J., Lowe, D.G., Bennett, G.L., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. & Goeddel, D.V. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science*, 252: 120-123, 1991.
 - Konturek, S.J., Szlachcic, A., Dembinski, A., Warzecha, Z., Jaworek, J. & Stachura, J. Nitric oxide in pancreatic secretion and hormone-induced pancreatitis in rats. *Int. J. Pancreatol.*, 15:19-28, 1994.
 - Krumschnabel, G., Sohm, B., Bock, F., Manzl, C. & Villunger, A. The enigma of caspase-2: the laymen's view. *Cell Death Differ.*, 16(2):195-207, 2009.
 - Kuhn, M. Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic Res. Cardiol.*, 99: 76-82, 2004.
 - Kujubu, D.A., Fletcher, B.S., Varnum, B.C., Lim, R.W. & Herschman, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.*, 266:12866-12872, 1991.

-
- Kumar, S. Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nature Reviews Cancer*, 9: 899-903, 2009.
 - Kuo, P.C. & Schroeder, R.A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg.*, 3: 220-235, 1995.
 - Lamar C. The inhibition of protein synthesis in a rat brain system by ethionine in vitro and in vivo. *J Neurochem*, 1461-8, 1971.
 - Lampel M. & Kern H.F. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch path Anat Histol*, 373: 97-117, 1977.
 - Langub, M.C. Jr, Watson, R.E. Jr. & Herman, J.P. Distribution of natriuretic peptide mRNAs in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 356: 183-199, 1995.
 - Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G. & Earnshaw W.C. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347, 1994.
 - Lerch, M.M. & Gorelick, F.S. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 144(6):1180-93, 2013.
 - Lin, Z.P., Zhu, Y.L., Johnson, D.R., Rice, K.P., Nottoli, T., Hains, B.C., McGrath, J., Waxman, S.G. & Sartorelli, A.C. Disruption of cAMP and prostaglandin E2 transport by multidrug resistance protein 4 deficiency alters cAMP-mediated signaling and nociceptive response. *Mol. Pharmacol.*, 73: 243-251, 2008.
 - Lincoln, T.M. & Cornwell, T.L. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.*, 7: 328-338, 1993.
 - Logsdon, C.D. & Ji, B. The role of protein synthesis and digestive enzymes in acinar cell injury. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 10(6): 362-370, 2013.
 - Lombardi, B., Estes, L.W., Longnecker D.S. "Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet." *Am J Pathol*, 79(3): 465-80, 1975.
 - Longnecker, D. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base. Version 1.0, March 21, 2014 [DOI:10.3998/panc.2014.3]*
 - Lowe, D.G. & Fendly, B.M. Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase. Hormone cross-linking and antibody reactivity distinguish receptor glycoforms. *J. Biol. Chem.*, 267: 21691-21697, 1992.
 - Lu, Z., Kolodecik, T.R., Karne, S., Nyce, M. & Gorelick, F. Effect of ligands that increase cAMP on caerulein-induced zymogen activation in pancreatic acini. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 285: G822-G828, 2003.

-
- Lu, Z., Kolodecik, T.R., Karne, S., Nyce, M. & Gorelick, F. Effect of ligands that increase cAMP on caerulein-induced zymogen activation in pancreatic acini. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 285: G822-G828, 2003.
 - Maack, T., Suzuki, M., Almeida, F.A., Nussenzweig, D., Scarborough, R.M., Mc Enroe, G.A. & Lewicki, J.A. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science*, 238: 675-678, 1987.
 - Maack, T. Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu. Rev. Physiol.*, 54: 11-27, 1992.
 - Majno, G. & Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol.*, 146: 3–15, 1995.
 - Malleo, G., Mazzon, E., Siriwardena, A.K. & Cuzzocrea, S. Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence. *Shock*, 28:130-140, 2007.
 - Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. & Evans, R.M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83:835-839, 1995.
 - Manimala, N.J., Frost, C.D., Lane, M.L., Higuera, M., Beg, R. & Vesely, D.L. Cardiac hormones target nuclear oncogenes c-Fos and c-Jun in carcinoma cells. *Eur. J. Clin. Invest.*, 43: 1156-1162, 2013.
 - Mao, L. & Qiu, Y. The classification of acute pancreatitis: Current status. *Intrac. Rare Dis. Res.*, 1:134-137, 2012.
 - Martinez Seeber, A., Vidal, N.A., Carchio, S.M. & Karara, A.L. Inhibition of water–sodium intestinal absorption by an atrial extract. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 64: 244-247, 1986.
 - Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Seibert, K. & Needleman, P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J. Clin. Invest*, 86:1375-1379, 1990.
 - Matsukawa, N., Grzesik, W.J., Takahashi, N., Pandey, K.N., Pang, S., Yamauchi, M. & Smithies, O. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of natriuretic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96:7403-7408, 1996.
 - McIlwain, D.R., Berger, T. & Mak, T.W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 5(4), 2013.
 - McKenzie, J.C., Tanaka, I., Misono, K.S. & Inagami, T. Immunocytochemical localization of atrial natriuretic factor in the kidney, adrenal medulla, pituitary, and atrium of rat. *J. Histochem. Cytochem.*, 33: 828-832, 1985.
 - McLay, J.S., Chatterjee, P.K., Mistry, S.K., Weerakoby, R.P., Jardine, A.G., McKay, N.G. & Hawksworth, G.M. Atrial natriuretic factor and angiotensin II stimulate nitric oxide release from human proximal tubular cells. *Clin Sci (Lond)* 89: 527-531, 1995.

-
- McMurray, J.J., Adamopoulos, S., Anker, S.D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.*,30: 1787-1847, 2012.
 - Mareninova, O.A., Kai-Feng Sung, K.F., Hong, P., Lugea, A., Pandol S.J., Gukovsky I. & Gukovskaya A.S. Cell Death in Pancreatitis, caspases protect from necrotizing pancreatitis. *The journal of biological chemistry*, 3370 –338, 2006.
 - Mettu, S.R., Wig, J.D., Khullar, M., Singh, G. & Gupta, R. Efficacy of serum nitric oxide level estimation in assessing the severity of necrotizing pancreatitis. *Pancreatology*. 3:506-513, 2003.
 - 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*, 1855-1862, 1995.
 - Moncada, S. & Higgs, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med.*, 329: 2002-12, 1993.
 - Moncada, S., Palmer, R.M.J. & Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.*, 109-141, 1991.
 - Morel, G., Chabot, J.G., Garcia-Caballero, T., Gossard, F., Dihl, F., Belles, I.M. & Heisler, S. Synthesis, internalization and localization of atrial natriuretic peptide in rat adrenal medulla. *Endocrinology*, 123:148-158, 1988.
 - Morita, R., Ukyo, N., Furuya, M., Uchiyama, T. & Hori, T. Atrial natriuretic peptide polarizes human dendritic cells toward a Th2-promoting phenotype through its receptor guanylyl cyclase coupled receptor A. *J. Immunol.*, 170: 5869-5875, 2003.
 - Mouawad, R., Li, Y. & Anand-Srivastava, M.B. Atrial natriuretic peptide C receptor-induced attenuation of adenylyl cyclase signaling activates phosphatidylinositol turnover in A10 vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.*, 65: 917-924, 2004.
 - Mukhopadhyay, A.K., Bohnet, H.G. & Leidenberger, F.A. Testosterone production by mouse Leydig cells is stimulated in vitro by atrial natriuretic factor. *FEBS Lett.*, 202: 111-116, 1986.
 - Murthy, K.S. & Makhlof, G.M. Identification of G-protein activating domain of the natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C). *J. Biol. Chem.*, 274: 17587-17592, 1999.
 - Murthy, K.S., Teng, B.Q., Zhou, H., Jin, J.G., Grider, J.R. & Makhlof, G.M. G(i-1)/G(i-2) dependent signaling by single transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 278: G974-G980, 2000.
 - Nagar, A.B. & Gorelick, F.S. Acute pancreatitis. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 20: 439-443, 2004.

-
- Nakamura Y., Do J.H., Yuan J., Odinkova I.V., Mareninova O., Gukovskaya A.S. & Pandol S.J. Inflammatory cells regulate p53 and caspases in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298: G92–G100, 2010.
 - Nakamura, T., Ito, T., Igarashi, H., Uchida, M., Hijioka, M., Oono, T., Fujimori, N., Niina, Y., Suzuki, K., Jensen, R.T. & Takayanagi, R. Cytosolic double-stranded DNA as a damage-associated molecular pattern induces the inflammatory response in rat pancreatic stellate cells: a plausible mechanism for tissue injury-associated pancreatitis. *Int J Inflamm.*, 504128, 2012.
 - Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R. & Lefkowitz, J.B. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 55: 69-102, 1986.
 - Niebergall-Roth, E. & Singer, M.V. Central and peripheral neural control of pancreatic exocrine secretion. *J. Physiol. Pharmacol.*, 52: 523-538, 2001.
 - Niebergall-Roth, E. & Singer, M.V. Control of pancreatic exocrine secretion via muscarinic receptors: which subtype(s) are involved? A review. *Pancreatology*, 3: 284-292, 2003.
 - Niederau, C., Ferrell, L.D. & Grendell, J.H. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology*. 88:1192-1204, 1985.
 - Nolan J.J., Ludvik, B., Beerdsen, P., Joyce, M. & Olefsky, J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med.*, 1188-1193, 1994.
 - Norman, J.G., Fink, G.W. & Franz, M.G. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch. Surg.*, 130: 966-970, 1995.
 - Ogawa, T., Bruneau, B., Yokota, N., Kuroski de Bold, M.L. & de Bold, A.J. Tissue-specific regulation of renal and cardiac atrial natriuretic factor gene expression in doxycorticosterone acetate-salt rats. *Hypertension*, 30: 1342-1347, 1997.
 - Ogawa, T. & de Bold, A.J. The heart as an endocrine organ. *Endocr. Connect.*, 3: R31-R44, 2014.
 - Ohyama, Y., Miyamoto, K., Saito, Y., Minamino, N., Kangawa, K. & Matsuo, H. Cloning and characterization of two forms of C-type natriuretic peptide receptor in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 183: 743-749, 1992.
 - Omary, M.B., Lugea, A., Lowe, A.W. & Pandol, S.J. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J. Clin. Invest.*, 117: 50-59, 2007.
 - O'Morchoe, C.C. Lymphatic System of the Pancreas. *Microsc. Res. Tech.*, 37: 456-477, 1997.
 - Ong, H., Lazure, C., Nguyen, T.T., McNicoll, N., Seidah, N., Chretien, M. & De Lean, A. Bovine adrenal chromaffin granules are a site of synthesis of atrial natriuretic factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147:957-963, 1987.

-
- Padanilam, B.J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.*, F608–F627, 2003.
 - Pagano, M. & Anad-Srivastava, M.B. Cytoplasmatic domain of natriuretic peptide receptor C constitutes Gi activator sequences that inhibit adenylyl cyclase activity. *J. Biol. Chem.*, 276: 22064-22070, 2001.
 - Pandey, K.N., Inagami, T. & Misono, K.S. Three distinct forms of atrial natriuretic factor receptors: kidney tubular epithelium cells and vascular smooth muscle cells contain different types of receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147:1146-1152, 1987.
 - Pandey, K.N., Pavlou, S.N., Kovacs, W.J. & Inagami, T. Atrial natriuretic factor regulates steroidogenic responsiveness and cyclic nucleotide levels in mouse Leydig cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138:399-404, 1987.
 - Pandey, K.N. & Singh, S. Molecular cloning and expression of murine guanylate cyclase/atrial natriuretic factor receptor cDNA. *J. Biol.Chem.*, 265:12342-12348, 1990.
 - Pandey, K.N. Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides*, 26: 901-932, 2005.
 - Pandol, S.J. Normal Pancreatic Function. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI:10.3998/panc.2015.17, 2015.
 - Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C. & Brancolini, C. Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3. *J. Biol. Chem.*, 276:21907–21915, 2001.
 - Peery, A.F., Dellon, E.S., Lund, J., Crockett, S.D., McGowan, C.E., Bulsiewicz, W.J., Gangarosa, L.M., Thiny, M.T., Stizenberg, K., Morgan, D.R., Ringel, Y., Kim, H.P., Dibonaventura, M.D., Carroll, C.F., Allen, J.K., Cook, S.F., Sandler, R.S., Kappelman, M.D. & Shaheen, N.J. Burden of Gastrointestinal Disease in the United States: 2012 Update. *Gastroenterology*, 143: 1179-1187, 2012.
 - Perides, G., Sharma, A., Gopal, A., Tao, X., Dwyer, K., Ligon, B. & Steer, M.L. Secretin differentially sensitizes rat pancreatic acini to the effects of supramaximal stimulation with caerulein. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 289: G713-721, 2005.
 - Pierce, K.L., Premont, R.T. & Lefkowitz, R.J. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Moll. Cell. Biol.*, 3: 639-650, 2002.
 - Phulwani, N.K. & Kielian, T. Poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs) 1-3 regulate astrocyte activation. *J Neurochem.*, 578-590, 2008.
 - Polito, F., Bitto, A., Irrera, N., Squadrito, F., Fazzari, C., Minutoli, L. & Altavilla, D. Flavocoxid, a dual inhibitor of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase, reduces pancreatic damage in an experimental model of acute pancreatitis. *Br. J. Pharmacol.*, 161:1002-1011, 2010.
 - Potter, L.R. & Hunter, T. Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 2164-2172, 1998.

-
- Potter, L.R. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J.*, 278:1808-1817, 2011.
 - Potter, L.R., Abbey-Hosch, S. & Dickey, D.M. Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Signaling Functions. *Endoc.Rev.*, 27: 47-72, 2006.
 - Puurunen, J. & Ruskoaho, H. Vagal-dependent stimulation of gastric acid secretion by intracerebroventricularly administered atrial natriuretic peptide in anaesthetized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 141: 493-495, 1987.
 - Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J. & Davis, R.J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.*, 270: 7420-7426, 1995.
 - Rakonczay, Z. Jr., Hegyi, P., Takács, T., McCarroll, J. & Saluja, A.K. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut*, 57: 259-267, 2008.
 - Rao, S.S., Watt, I.A., Donaldson, L.A., Crocket, A. & Joffe, S.N. A serial histologic study of the development and progression of acute pancreatitis in the rat. *Am. J. Pathol.*, 103:39-46, 1981.
 - Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J. & Borst, P. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 9244-9349, 2003.
 - Renner, I.G., Wisner, J.R. Jr. & Rinderknecht H. Protective effects of exogenous secretin on ceruletide-induced acute pancreatitis in the rat. *J. Clin.Invest.*, 72:1081-1092, 1983.
 - Renner, I.G. & Wisner, J.R. Jr. Ceruletide-induced acute pancreatitis in the dog and its amelioration of exogenous secretin. *Int. J. Pancreatol.*, 1:39-49, 1986.
 - Renner, I.G., Wisner, Jr. & Lavigne, B.C. Partial restoration of pancreatic function by exogenous secretin in rats with ceruletide-induced acute pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 31:305-313, 1986.
 - Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J. & Glass, C.K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391:79-82, 1998.
 - Rius, M., Thon, W.F., Keppler, D. & Nies, A.T. Prostanoid transport by multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) localized in tissues of the human urogenital tract. *J. Urol.* 174:2409-2414, 2005.
 - Rodríguez, M.R., Diez, F., Ventimiglia, M.S., Morales, V., Copsel, S., Vatta, M.S., Davio, C.A. & Bianciotti, L.G. Atrial natriuretic factor stimulates efflux of cAMP in rat exocrine

- pancreas via multidrug resistance-associated proteins. *Gastroenterology*, 140: 1292-1302, 2011.
- Rose, R.A. & Giles, W.R. Natriuretic peptide C receptor signaling in the heart and vasculature. *J. Physiol.*, 586: 353-366, 2008.
 - Rubattu, S., Sciarretta, S., Morriello, A., Calvieri, C., Battistoni, A. & Volpe, M. (2010). NPR-C: a component of the natriuretic peptide family with implications in human diseases. *J Mol Med.*, 88: 889-897, 2010.
 - Sabbatini, M.E., Rodríguez, M.R., di Carlo, M.B., Davio, C.A., Vatta, M.S. & Bianciotti, L.G. C-type natriuretic peptide enhances amylase release through NPR-C receptors in the exocrine pancreas. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 293: G987-G994, 2007a
 - Sabbatini, M.E., Vatta, M.S., Davio, C.A. & Bianciotti, L.G. Atrial natriuretic factor negatively modulates secretin intracellular signaling in the exocrine pancreas. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 292: G349-G357, 2007b.
 - Sabbatini, M.E., Villagra, A., Davio, C.A., Vatta, M.S., Fernandez, B.E. & Bianciotti, L.G. Atrial natriuretic factor stimulates exocrine pancreatic secretion in the rat through NPR-C receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 285: G929-G937, 2003.
 - Sabbatini, M.E. Natriuretic peptides as regulatory mediators of secretory activity in the digestive system. *Regul. Pep.*, 154: 5-15, 2009.
 - Sah, R.P. & Saluja, A. Molecular mechanisms of pancreatic injury. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 27: 444-451, 2011.
 - Sah, R.P., Dawra, R.K. & Saluja, A.K. New Insights into the Pathogenesis of Pancreatitis. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 29: 523-530, 2013.
 - Saluja, A., Hofbauer, B., Yamaguchi, Y., Yamanaka, K. & Steer, M. Induction of apoptosis reduces the severity of caerulein-induced pancreatitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 220(3):875-8, 1996.
 - Saluja A., Saito I., Saluja M., Houlihan M.J., Powers R.E., Meldolesi J., Steer M. In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. *Am J Physiol*, 249(6 Pt 1): G702-10, 1985.
 - Samuel, I., Zaheer, S., Fisher, R.A. & Zaheer, A. Cholinergic receptor induction and JNK activation in acute pancreatitis. *Am. J. Surg.*, 186 :569-574, 2003.
 - Samuel, I., Zaheer, S. & Zaheer, A. Bile-pancreatic juice exclusion increases p38MAPK activation and TNF-alpha production in ligation-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreatology*, 5 : 20-26, 2005.
 - Samuel, I., Zaheer, A. & Fisher, R.A. In vitro evidence for role of ERK, p38, and JNK in exocrine pancreatic cytokine production. *J. Gastrointest. Surg.*, 10: 1376-1383, 2006.

-
- Sandoval, D., Gukovskaya, A., Reavey, P., Gukovsky, S., Sisk, A., Braquet, P., Pandol, S.J. & Poucell-Hatton, S. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. *Gastroenterology*, 111:1081-91, 1996.
 - Satoh, A., Shimosegawa, T., Fujita, M., Kimura, K., Masamune, A., Koizumi, M. & Toyota, T. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation improves the survival of rats with taurocholate pancreatitis. *Gut*, 44: 253-258, 1999.
 - Sauna, Z.E., Nandigama, K. & Ambudkar, S.V. Multidrug resistance protein 4 (ABCC4)-mediated ATP hydrolysis: effect of transport substrates and characterization of the post-hydrolysis transition state. *J. Biol. Chem.* 279:48855-48864, 2004.
 - Savoie, P., de Champlain, J. & Anand-Srivastava, M.B. C-type natriuretic peptide and brain natriuretic peptide inhibits adenylyl cyclase activity: interaction with ANF-R2/ANP-C receptors. *FEBS Lett*, 370: 6-10, 1995.
 - Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 191-195, 2002.
 - Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, 1675-87, 1998.
 - Schmid, R.M. & Adler, G. NF-kappaB/rel/IkappaB: implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology*, 118: 1208-1228, 2000.
 - Schmid, S., Uhl, W. & Büchler, M.W. Protease-antiprotease interactions and the rationale for therapeutic protease inhibitors. *Scand. J. Gastroenterol.*, 219: 47-50, 1996.
 - Sen, R. & Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47: 921-928, 1986.
 - Serou, M.J., DeCoster, M.A. & Bazan, N.G. Interleukin-1 beta activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: platelet-activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression. *J. Neurosci. Res.*, 58: 593-598, 1999.
 - Seta, T., Noguchi, Y., Shikata, S. & Nakayama, T. Treatment of acute pancreatitis with protease inhibitors administered through intravenous infusion: an updated systematic review and meta analysis. *BMC Gastroenterol.*, 14:102, 2014.
 - Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beauchamp, R.D. & DuBois, R.N. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.*, 58: 362-366, 1998.
 - Shih, V., Tsui, R., Caldwell, A. & Hoffmann, A. A single NFkB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.*, 21: 86-102, 2011.
 - Shrivastava, P. & Bhatia, M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.*, 16: 3995-4002, 2010.

-
- Singh, V.P. & Chari, S.T. Protease inhibitors in acute pancreatitis: lessons from the bench and failed clinical trials. *Gastroenterology*, 128: 2172-2174, 2005.
 - Sjöstrand, F.S. & Hanzon, V. Membrane structures of cytoplasm and mitochondria in exocrine cells of mouse pancreas as revealed by high resolution electron microscopy. *Exp. Cell Res.*, 7: 393-414, 1954.
 - Slogoff, M.I., Ethridge, R.T., Rajaraman, S. & Evers, B.M. COX-2 inhibition results in alterations in nuclear factor (NF)-kappaB activation but not cytokine production in acute pancreatitis. *J. Gastrointest. Surg.*, 8:511-519, 2004.
 - Smith, W.L., Garavito, R.M. & DeWitt, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, 271: 33157-33160, 1996.
 - Soldani, C., Lazzè, M.C., Bottone, M.G., Tognon, G., Biggiogera, M., Pellicciari, C.E. & Scovassi, A.I. Poly (ADP-ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and where? *Exp Cell Res.*, 193-201, 2001.
 - Song, A.M., Bhagat, L., Singh, V.P., Van Acker, G.G., Steer, M.L. & Saluja, A.K. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283: 1166-1174, 2002.
 - Steinberg, W. & Tenner, S. Acute pancreatitis. *N. Engl. J. Med.*, 330:1198-1210, 1994.
 - Steinle, A.U., Weidenbach, H., Wagner, M., Adler, G. & Schmid, R.M. NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology*, 116: 420-430, 1999.
 - Suda, M., Tanaka, K., Fukushima, M., Natsui, K., Yasoda, A., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Itoh, H. & Nakao, K. C-type natriuretic peptide as an autocrine/paracrine regulator of osteoblast. Evidence for possible presence of bone natriuretic peptide system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 223:1-6, 1996.
 - Suenobu, N., Shichiri, M., Iwashina, M., Marumo, F. & Hirata, Y. Natriuretic peptides and nitric oxide induce endothelial apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19: 140-146, 1999.
 - Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology*, 130:229-239, 1992.
 - Sugiyama, I., Kato S, Mitsufuji S, Okanoue T, Takeuchi K. Pathogenic role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS/NOS-III) in cerulein-induced rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci.*, 51:1396-403, 2006.
 - Tani S., Itoh H., Okabayashi Y., Nakamura T., Fujii M., Fujisawa T., Koide M., Otsuki M. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig Dis Sci.*, 35(3):367-74, 1990.

-
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell*, 801-809, 1995.
 - Thornberry, N.A & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science*, 281: 1312–1316, 1998.
 - Tinel, N. & Tschopp, J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*, 843–846, 2004.
 - Tonsi, A.F., Bacchion, M., Crippa, S., Malleo, G. & Bassi, C. Acute pancreatitis at the beginning of the 21st century: the state of the art. *World J. Gastroenterol.*, 15: 2945-2959, 2009.
 - Topazian, M. & Gorelick, F.S. Textbook of Gastroenterology (Yamada Y, Applers DH, Laine L, Owyang C & Powell DW, Eds). *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. pp 2121-2150, 1999*
 - Tremblay, J., Desjardins, R., Hum, D., Gutkowska, J. & Hamet, P. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol. Cell. Biochem.*, 230: 31-47, 2002.
 - Tremblay, J., Huot, C., Koch, C. & Potier, M. Characterization of the functional domains of the natriuretic peptide receptor/guanylate cyclase by radiation inactivation. *J. Biol. Chem.*, 266: 8171- 8175, 1991.
 - Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M. & Margioris, A.N. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int. J. Biochem Cell Biol.*, 38: 1654-1661, 2006.
 - Tsukagoshi, H., Shimizu, Y., Kawata, T., Hisada, T., Shimizu, Y., Iwamae, S., Ishizuka, T., Iizuka, K., Dobashi, K. & Mori, M. Atrial natriuretic peptide inhibits tumor necrosis factor-alpha production by interferon-gamma-activated macrophages via suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B activation. *Regul. Pept.*, 99:21-29, 2001.
 - Uhl, W., Schrag, H.J., Schmitter, N., Aufenanger, J., Nevalainen, T.J. & Büchler, M.W. Experimental study of a novel phospholipase A2 inhibitor in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.*, 85: 618 -623, 1998.
 - Ulrich, C.D., Holtmann, M. & Miller, L.J. Secretin and Vasoactive Intestinal Peptide Receptors: Members of a Unique Family of G Protein-Coupled Receptors. *Gastroenterology*, 114:382-397, 1998.
 - Um, S.H., Kwon, Y.D., Kim, C.D., Lee, H.S., Jeon, Y.T., Chun, H.J., Lee, S.W., Choi, J.H., Ryu, H.S. & Hyun, J.H. The role of nitric oxide in experimental cerulein induced pancreatitis. *J. Korean Med. Sci.*,18:520-526, 2003.
 - Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage. *Oncogene*,

5683–5692, 2006.

- van Acker, G.J., Perides, G. & Steer, M.L. Co-localization hypothesis: A mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.*, 12:1985-1990, 2006.
- van Acker, G.J., Saluja, A.K., Bhagat, L., Singh, V.P., Song, A.M. & Steer, M.L. Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283:G794-G800, 2002.
- van Acker, G.J., Weiss, E., Steer, M.L. & Perides, G. Cause-effect relationships between zymogen activation and other early events in secretagogue-induced acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 292:G1738-G1746, 2007.
- Van de Craen, M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W. & Vandenabeele, P. The proteolytic procaspase activation network: An in vitro analysis. *Cell Death Differ.* 1117–1124, 1999.
- van Ooijen, B., Kort, W.J., Zijlstra, F.J., Vincent, J.E., Wilson, J.H. & Westbroek, D.L. Prostanoid imbalance in experimental acute pancreatitis in rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, 23: 193-198, 1998.
- Vaquero, E., Gukovsky, I., Zaninovic, V., Gukovskaya, A.S. & Pandol, S.J. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 280: G1197-G1208, 2001.
- Ventimiglia, M.S., Rodriguez, M.R., Elverdín, J.C., Davio, C.A., Vatta, M.S. & Bianciotti, L.G. Atrial natriuretic factor intracellular signaling in the rat submandibular gland. *Regul. Pept.*, 150: 43-49, 2008.
- Ventimiglia, M.S., Najenson, A.C., Perazzo, J.C., Carozzo, A., Vatta, M.S., Davio, C.A. & Bianciotti, L.G. Blockade of multidrug resistance-associated proteins aggravates acute pancreatitis and blunts atrial natriuretic factor's beneficial effect in rats: Role of MRP4 (ABCC4). *Mol. Med.*, 21: 58-67, 2015.
- Venugopal, J. Cardiac natriuretic peptides-hope or hype? *J. Clin. Pharm. Ther.*, 26:15-31, 2001.
- Vollmar, A.M., Colbatzky, F., Hermanns, W. & Schulz, R. Origin and characterization of atrial natriuretic peptide in the rat parotid gland. *Anat. Embryol. (Berl)*, 184: 331-335, 1991.
- Vollmar, A.M., Paumgartner, G. & Gerbes, A.L. Differential gene expression of the three natriuretic peptides and natriuretic peptide receptor subtypes in human liver. *Gut*, 40:145-150, 1997.
- Vollmar, B., Waldner, H., Schmand, J., Conzen, P.F., Goetz, A.E. & Habazettl, H. Release of arachidonic acid metabolites during acute pancreatitis in pigs. *Scand. J. Gastroenterol.*, 24: 1253-1264, 1998.

-
- von Lukowicz, T., Hassa, P.O., Lohmann, C., Borén, J., Braunersreuther, V., Mach, F., Odermatt, B., Gersbach, M., Camici, G.G., Stähli, B.E., Tanner, F.C., Hottiger, M.O., Lüscher, T.F. & Matter, C.M. PARP1 is required for adhesion molecule expression in atherogenesis. *Cardiovasc Res.*, 156-166, 2008.
 - Wang, D., Mann, J.R. & DuBois, R.N. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 128:1445-1461, 2005.
 - Wank, S.A. G protein-coupled receptors in gastrointestinal physiology. I.CCK receptors: an exemplary family. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 274:G607-G613, 1998.
 - Watanabe, O., Baccino, F.M., Steer, M.L. & Meldolesi, J. Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Am J Physiol*, 457-467, 1984.
 - Whitcomb, D.C. Acute Pancreatitis: Molecular Biology Update. *J. Gastrointest. Surg.*, 7: 940-942, 2003.
 - Whitcomb, D.C. Genetic aspects of pancreatitis. *Annu. Rev. Med.*, 61: 413-424, 2010.
 - Wiedermann, C.J., Niedermuhlbihler M. & Braunsteiner H. Priming of polymorphonuclear neutrophils by atrial natriuretic peptide in vitro. *J Clin Invest.*, 932-41, 1992.
 - Williams, C.S. & DuBois, R.N. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am. J. Physiol.*, 270: G393-G400, 1996.
 - Williams, J.A. & Blevins, G.T. Jr. Cholecystokinin and regulation of pancreatic acinar cell function. *Physiol. Rev.*, 73:701-723, 1993.
 - Williams, J.A., Korc, M. & Dormer, R.L. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am J Physiol.*, 235:517-24, 1978.
 - Williams, J.A. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin- regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu. Rev. Physiol.* 2001. 63:77-97, 2001.
 - Williams, J.A. Receptor-mediated signal transduction pathways and the regulation of pancreatic acinar cell function. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24:573-579, 2008.
 - Williams, J.A. Regulation of acinar cell function in the pancreas. *Curr. Opin. Gastroenterol*, 26: 478-483, 2010.
 - Wolf, B.B. & Green, D.R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem.*, 20049-20052, 1999.
 - Wong, J.C. & Fiscus, R.R. Essential roles of the nitric oxide (no)/cGMP/protein kinase G type-I α (PKG-I α) signaling pathway and the atrial natriuretic peptide (ANP)/cGMP/PKG-I α autocrine loop in promoting proliferation and cell survival of OP9 bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 829-839, 2011.

-
- Woodard, G.E., Xiaohong, L. & Rosado, J.A. Characterization of the renal C-type natriuretic peptide receptor in hypertrophied and developing rat kidney. *J. Mol. Endocrinol.*, 35: 519-530, 2005.
 - Woodard, G.E., Rosado, J.A. & Brown, J. Expression and control of C-type natriuretic peptide in rat vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 282: 156-165, 2002.
 - Wu, C., Bishopric, N.H. & Pratt, R.E. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, 272: 14860-14866, 1997.
 - Wyllie, A.H. Death from inside out: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 345: 237-241, 1994.
 - Xiao, C.Y., Chen, M., Zsengellér, Z., Li, H., Kiss, L., Kollai, M. & Szabó, C. Poly (ADP-Ribose) polymerase promotes cardiac remodeling, contractile failure, and translocation of apoptosis-inducing factor in a murine experimental model of aortic banding and heart failure. *J Pharmacol Exp Ther.*, 891-898, 2005.
 - Xu, P., Zhou, X.J., Chen L.Q., Chen, J. Xie, Y., Lv, L. & Hou, X. Pioglitazone attenuates the severity of sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 1983-1988, 2007.
 - Xu, P., Lou, X.L., Chen, C. & Yang, Z.W. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation on apoptosis in rats with acute pancreatitis. *Dig. Dis Sci.*, 58: 3516-3523, 2013.
 - Yamada, T., Kotake, Y., Nagata, H. & Takeda J. Atrial natriuretic peptide reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rabbits. *J. Anesth.*, 27: 901-908, 2013.
 - Yancy, C.W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D.E., Drazner, M.H., et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 62: e147-239, 2013.
 - Yang, W.L. & Frucht, H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 22: 1379-1383, 2001.
 - Yang, Z.W., Meng, X.X. & Xu, P. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *J. Cell. Mol. Med.*, 19: 2513-2520, 2015.
 - Yuan, S., Rosenberg, L., Ilieva, A., Agapitos, D. & Duguid, W.P. Early changes of gene expression during cerulein supramaximal stimulation. *Pancreas*, 19: 45-50, 1999.
 - Zhang, W., Cao, X., Chen, D., Wang, J.W., Yang, H., Wang, W., Mohapatra, S., Hellerman, G., Kong, X., Lockey, R.F. & Mohapatra, S. Plasmid-encoded NP 73-102 modulates atrial natriuretic peptide receptor signaling and plays a critical role in inducing tolerogenic dendritic cells. *Genet. Vaccines Ther.*, 9:3-12, 2

- Zhou, W., Levine, B.A. & Olson, M.S. Lipid mediator production in acute and chronic pancreatitis in the rat. *J. Surg. Res.*, 56: 37-44, 1994.
- Zhu, Y.B., Zhang, Y.B., Liu, D.H., Li, X.F., Liu, A.J., Fan, X.M., Qiao, C.H., Ling, F. & Liu, Y.L. Atrial natriuretic peptide attenuates inflammatory responses on oleic acid-induced acute lung injury model in rats. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 126: 747-750, 2013.