Paper de la PAP en la resposta inflamatoria durant la pancreatitis aguda

2006 BE 00174

Daniel Closa

Informe final.

Desembre 2007

Antecedents:

L'agressió a un teixit posa en marxa un programa genètic de resposta a l'estress. En el cas del pàncrees, la pancreatitis aguda s'acompanya d'un intens reordenament en l'expressió gènica durant el qual la secreció d'enzims es veu considerablement disminuïda mentre que la síntesi de proteïnes d'estress augmenta considerablement. Entre aquestes proteïnes, la PAP n'és la més destacada.

La PAP és una proteïna de 17 kDa que indueix la seva expressió en resposta a diferents mediadors de la inflamació (citoquines, LPS, radicals lliures, etc) però també en resposta a diferents formes d'agressió cel•lular (hipòxia, tòxics, agents pro-apoptòtics, etc). La PAP no és exclusiva del pàncrees i també s'expressa en el budell, augmentant els seus nivells des del duodè fins l'ili, tot i que basalment no s'expressa en el còlon. En canvi, s'ha descrit que durant la malaltia inflamatoris intestinal, te lloc una potent inducció de la PAP en colon.

Una sèrie de treballs recents ha posat de manifest que una de les principals funcions de la PAP pot ser anti-inflamatòria. Per exemple, en línies acinars pancreàtiques (AR42J) i colònica (HT29) la PAP bloqueja la translocació del factor nuclear kappa B (NFkB) induïda per TNF. També, experiments in vivo centrats en el pàncrees han demostrat que induir l'expressió de PAP abans d'una pancreatitis aguda disminueix significativament la mortalitat en els animals. Inversament, l'administració d'anticossos bloquejants contra la PAP desprès de la inducció d'una pancreatitis aguda experimental augmenta la severitat del procés. D'altra banda, resultats obtinguts en biòpsies de pacients afectats per Malaltia inflamatoria Intestinal mostren un augment significatiu en l'expressió de la PAP durant els brots inflammatoris. I finalment, la incubació amb PAP de mucoses de pacients afectats per la malaltia de Crohn va resultar en una important reducció en la secreció de citoquines pro-inflamtòries.

Totes aquestes dades suggerexen un paper protector enfrotn la inflamació per part de la PAP. Els estudis in vitro suggereixen que te lloc a traves de receptors cel.lulars, ja que afegir la proteina al medi reprodueix aquests efectes.

Per tot plegat, hem proposat la hipòtesi que la PAP pot formar part d'una familia de proteines funcionalment properes a la IL-10. També hem pogut demostrar que la PAP actua activant la via de transduccio de STAT3.

Métodes:

Model de pancreatitis:

La pancretitis es va induír a ratolins KO pel gen de la PAP (PAP -/-) i de la corresponent soca salvatge PAP +/+ (w.t.) amb 6 administracions intraperitoneals de ceruleína a dosis supra-màximes, espaiades una hora cada una. Els animals es van sacrificar a diferents temps (entre 0 i 48 h) després de la primera administració. Al moment del scacrifici es va obtenir el sèrum, que es conservà a -80℃ i els teixits pancreàtic i pulmonar. Una part del teixit es destinà a histologia i la resta es congelà a -80℃ fins al moment de ser processat.

Determinacions

La severitat de la pancreatitis s'avaluà pels nivells sèrics de lipasa i amilasa (marcadors de lesió acinar en aquest model). La inflamació es determinà mesurant l'activitat mieloperoxidasa en teixit (marcador de la presència de neutròfils) i pel grau d'edema tisular calculat com a relació entre pes fresc i pes sec del teixit. La histologia es va destinar a determinar la severitat de les lesions en les cèl.lules acinars (edema, vacuolització infiltrat cel.lular i necrosi) segons una escala semi-quantitativa de l'1 al 4 i per determinacions d'imunohistoquímica. L'apoptosi es determinà per la tècnica del TUNEL i per inmuno-histoquímica contra la forma activa de la Caspasa 3. Finalment el grau de regeneració s'estimà avaluant la incorporació de BrdU. L'expressió de citoquines, de PAP i altres factors relacionats es va avaluar amb la técnica de la RT-PCR semi-quantitativa.

Resultats:

Expressió de PAP: Es va comprovar l'expressió de PAP en animals w.t. així com la absència d'expressió den els animals KO. Aquest fet no va modificar l'expressió de la resta de proteines de la familia PAP/Reg. Tant RegI, RegII, com Reg IIIγ no es van veure alterades, mentre que Reg IIIβ (PAP) va desaparèixer completament en els KO.

Severitat de la pancreatitis: Les anàlisis d'amilasa i lipasa mostraren un perfil típic de progresió de la pancreatitis, arribatn al màxim nivell plasmàtic a les 9 hores, i disminuint, endcara que sense arribar al nivell basal a les 24 hores. Els animals KO per la PAP van mostrar en tot cas uns valors menors de lipasa i amilasa. Aquesta diferéncia es va poder veure també a nivell histológic. Els animals KO per la PAP van mostrar un grau de necrosi acinar pancreàtica més reduit que no pas els corresponents animals w.t. En un grup adicional es va administrar PAP als animals KO i els nivells de lipasa amilasa i els marcadors de necrosi van recuperar els valors dels animals w.t.

Nivells d'apoptosi: Al contrari que amb la necvrosi, els animals KO per la PAP van mostrar en tot moment un garu d'inducció de vies apoptótiques superior al dels corresponents w.t. Això es va observar tant per la activació de la PARP, la fragmentació de la caspasa 3 i per TUNEL. En el grup adicional en que es va administrar PAP als animals KO es va revertir l'activació de les vies apoptótiques.

Inflamació: La resposta inflamatória va ser més intensa en els animals KO per la PAP. Això es va veure en els majors valors de MPO en teixit pancreàtic, així com en una intensa expressió de citoquines (TNFa, IL-6, IL-1). De nou, aquests efectes es van revertir per l'administració de PAP exògena als animals KO.

Conclusions:

- Els resultats obtinguts confirmen in vivo algunes dades que ja es tenien in vitro. La PAP actua com factor anti-inflamatori i la seva absència resulta en un procés inflamatori pancreàtic més intens. Amb major infiltrat leucocitari i major generació de citoquines per part del teixit pancreàtic durant la pancreatitis aguda experimental.
- D'altra banda, encara que pot semblar contradictori, el grau de dany al teixit es menior en absència de PAP. Això es pot explicar per la seva activitat anti-apoptótica, que també hem pogut verificar en aquest model. En animals amb dèficit de PAP té lloc una potent activació de vies apoptótiques, cosa que resulta en una menor inducció dels mecanismes de necrosi.