

DEPARTAMENTO INTERFACULTATIVO DE FISIOLOGIA ANIMAL

Prof. F. J. MATAIX

NUEVA TECNICA EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO
DE LA SECRECION PANCREATICA EXOCRINA EN EL POLLO
ANESTESIADO Y NO ANESTESIADO

G. M. SALIDO, A. ESTELLER y M. A. LÓPEZ

RESUMEN

Se ha desarrollado en pollos broiler una nueva técnica quirúrgica para el estudio de la secreción pancreática exocrina. Los animales se intervenían en condiciones de asepsia para colocar sendas cánulas en el conducto pancreático principal. Tres días después de la primera intervención parte de los animales ($n = 10$) se dedicaron a experimentos crónicos y otros ($n = 10$) tras nueva anestesia a experimentos agudos. El tiempo de recuperación desde la primera intervención permitió en todos los casos evitar los problemas mecánicos inherentes a la canulación del conducto pancreático, siendo ésta la primera vez que se logra dicho avance. Esta técnica quirúrgica permite comparar los resultados de flujo y composición enzimática y electrolítica del jugo pancreático en animales anestesiados y no anestesiados. Por otra parte la bondad de la preparación se comprueba no sólo por la constancia del flujo de jugo pancreático y de la concentración enzimática y electrolítica del mismo, sino también por la larga supervivencia de los animales y por los estudios histológicos postmortem.

SUMMARY

A new surgical technique in order to study exocrine pancreatic secretion in broiler chickens has been devised. Animals were operated under aseptic conditions to place two cannulae both into main pancreatic duct. Three days after surgery some chickens ($n = 10$) were used in chronic experiments and some ($n = 10$) in acute experiments being previously reanaesthetized. The recovering period of time from first intervention allows in all cases to avoid mechanical problems inhereents to cannulation of pancreatic duct.

This methodologic advance has been achieved for the first time. Our technique allows us to establish main differences of flow and enzymatic and electrolitic composition of pancreatic juice in animals either conscious or anaesthetized. Our preparation works properly as showed not only because flow and composition of pancreatic juice keep constant, and because the long survival period of animals but also by the histological postmortem controls.

INTRODUCCION

La pobreza de publicaciones acerca de la secreción pancreática exocrina en el pollo no sólo afecta al número de las mismas sino a la escasa información que de ellas se deriva, la cual, en la mayoría de los casos, es contradictoria.

Entendemos que ello se debe, al menos en parte, a la dispersión existente en los métodos experimentales empleados así como a la falta de optimización de las manipulaciones quirúrgicas que para el estudio de la secreción son necesarias.

Varios autores (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) han estudiado aspectos parciales de la secreción pancreática exocrina en pollos tanto anestesiados como no anestesiados, y los principales problemas metodológicos que encuentran se derivan bien de la obstrucción de las cánulas (2, 4, 5) bien del modo de reingresar o no el jugo pancreático recogido (1, 3, 5,* pueden ser irregulares o anómalos.

Describimos en este trabajo el conjunto de manipulaciones quirúrgicas llevadas a cabo tanto en animales anestesiados como no anestesiados, así como los resultados de las pruebas realizadas con el fin de observar la idoneidad de las preparaciones realizadas según el método que se propone.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado pollos broiler de pesos comprendidos entre 2 y 3 kg. procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. El período de ayuno previo a la intervención se estandarizó, estimándose adecuado retirarles la comida 24 horas antes de la operación, si bien se les permitió el libre acceso al agua.

Los animales destinados a su utilización en experimentos crónicos se anestesian por vía endovenosa a través de un cateter introducido en la vena dística (0,025-0,05 g.) administrado lenta y progresivamente bajo vigilancia de los reflejos oculoparpebral y plantar. Como inductor de la anestesia se utiliza benzodiacepan (Valium N. R.) en dosis de 10 mg/kg.

Tras un minucioso desplumado del campo operatorio, se desinfecta éste con torundas empapadas en tintura de yodo. A continuación se fija el animal a una mesa de quirófano y, empleando material estéril, se procede a la intervención dentro de unas rigurosas condiciones de asepsia.

Se realiza entonces laparatomía lateral derecha, de unos 4 centímetros, a través de la cual se localiza el páncreas, y en él, el conducto pancreático principal, que se disecciona a unos 5 mm. de su desembocadura en el duodeno y se practican dos incisiones por las que se introducen sendas cánulas de Silastic (R) cuyos extremos están provistos de una pequeña punta de polietileno que da una mayor consistencia (Fig. 1).

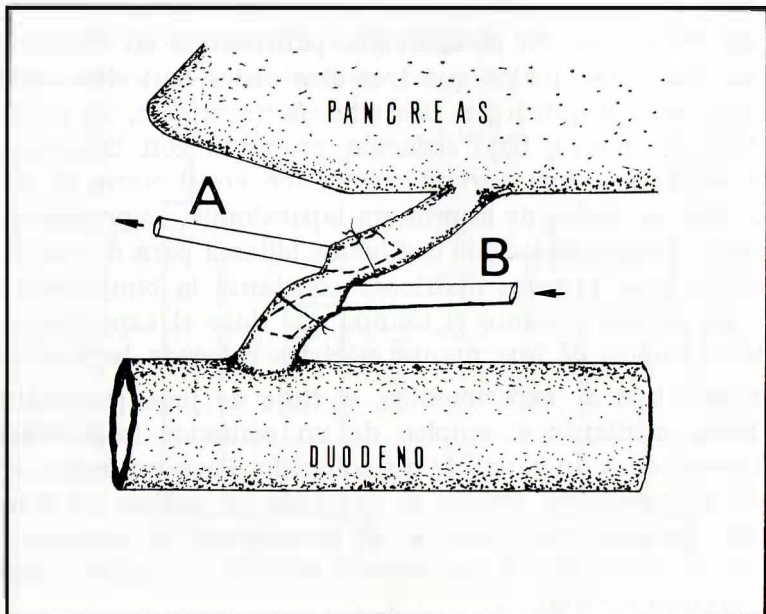


Figura 1.—Disposición de las cánulas de recogida de jugo pancreático (A) y de reingreso del mismo (B), en el conducto pancreático principal.

La cánula implantada en sentido duodeno-páncreas nos permite la recogida de jugo pancreático, y la otra cánula, en sentido páncreas-duodeno, se utiliza para el reingreso del jugo pancreático no necesario para análisis. Ambas cánulas se aseguran con ligaduras de lino (Braun núm. 0) y se exteriorizan a través de la pared abdominal derecha mediante una herida de transfixión. La herida abdominal se cierra por planos con sutura de seda atraumática (Braun núm. 0).

Tanto la zona de sutura como la de afloramiento de las cánulas se impregnan cubriéndose posteriormente con un vendaje plástico.

El tiempo de recuperación de la anestesia varió entre una y dos horas, facilitándoseles a las seis horas el acceso al agua y a las doce a la comida.

El jugo pancreático secretado se recoge en bolsas de plástico taradas que se resguardan en un bolsillo existente en los trajes con que son provistos los animales, que les permiten moverse libremente y llevar a cabo las funciones fisiológicas de alimentación y excreción sin impedimento alguno.

Para el estudio de la fisiología pancreática en experimentos agudos, utilizamos pollos que tres días antes han sido sometidos a la intervención quirúrgica descrita anteriormente, los cuales son sometidos de nuevo, bajo sedación profunda con benzodiacepan (20-60 mg/kg.), a una segunda operación en el curso de la cual, y tras abrir la herida de la primera laparatomía, se procede a ligar el píloro, se canulan los dos conductos biliares para drenar la bilis al exterior y se procura mantener constante la temperatura corporal del animal durante el tiempo que dure el experimento mediante el empleo de una manta eléctrica colocada bajo el mismo.

En este tipo de experimentos, el flujo de jugo pancreático se determina mediante el empleo de un contador fotoeléctrico de gotas acoplado a un canal de un polígrafo. Para un mayor conocimiento del estado del animal se implanta un catéter en la arteria carótida derecha, que unido a un transductor de presión y éste a su vez a un polígrafo nos permite obtener un registro continuo de la presión arterial.

Técnicas analíticas utilizadas.

El contenido en proteínas totales del jugo pancreático se determina utilizando espectrofotometría directa a 280 nm expresándose los resultados en micromoles de l-Tirosina. Los valores se consideran significativos de acuerdo con diversos autores (8).

La actividad amilásica se determina siguiendo la técnica de Noelting y Bernfeld (9) expresándose los resultados en unidades arbitrarias de actividad amilásica (10).

Los cloruros se determinan por volumetría potenciométrica con NO_3Ag 0,01 N, los cationes sodio y potasio por fometría de llama y el anión bicarbonato empleando y Mancusi-Ungaro (11) cuya validez en el caso del jugo pancreático del pollo fue previamente comprobada por nosotros.

RESULTADOS Y DISCUSION

La composición orgánica del jugo pancreático obtenido de animales anestesiados (A) y no anestesiados (NA) se representa en la figura 2. En ella se observa que la actividad amilásica es elevada, muy superior a la encontrada en nuestro Departamento con idén-

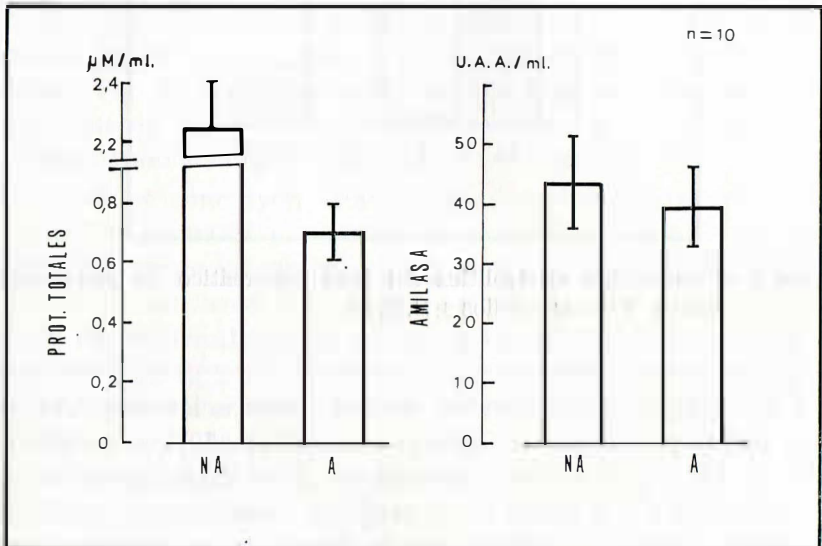


Figura 2.—Concentración de proteína total ($\mu\text{M}/\text{ml}$) y de amilasa (U.A.A./ml) en jugo pancreático de pollos anestesiados (A) y no anestesiados (NA). Media \pm S. E. M.

tico método analítico en el conejo (12), en el mandril (13) y en el perro (14). La concentración de proteína total es mayor en los animales no anestesiados, hecho que puede deberse a una mayor producción de mucoproteínas. En cuanto a los electrolitos presentes en el jugo pancreático, solamente medidos en animales anestesiados, sólo es destacable el hecho de ser los niveles de sodio, cloruros y bicarbonato superiores a los encontrados por nosotros en plasma (152, 112 y 23 mEq/l respectivamente) lo que sugiere algún tipo de fenómeno activo en la incorporación de dichos iones al jugo pancreático (Fig. 3).

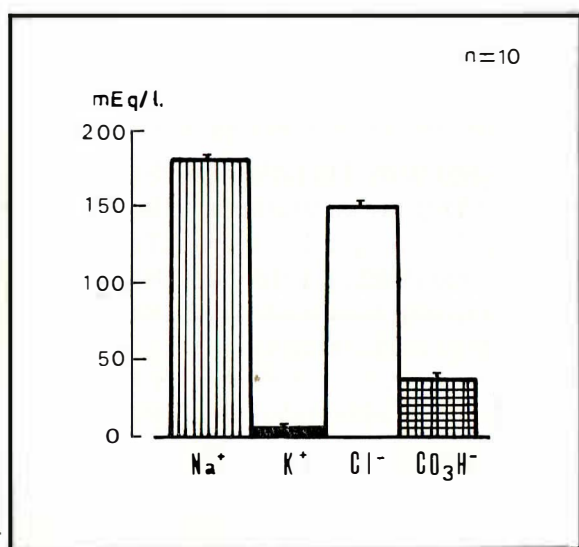


Figura 3.—Composición electrolítica del jugo pancreático de pollos anestesiados. Valores medios \pm S. E. M.

Para comprobar la bondad de las preparaciones quirúrgicas, a los pollos provistos de fistulas crónicas ($n=10$) se les midió el flujo de jugo pancreático durante los doce días siguientes a la operación, de 8 a 9 horas de la mañana y siempre en condiciones de ayuno. Como se muestra en la figura 4, las mayores oscilaciones de flujo se presentan en los tres primeros días, a partir de los cuales se observa una mayor estabilidad en el flujo de jugo pancreático.

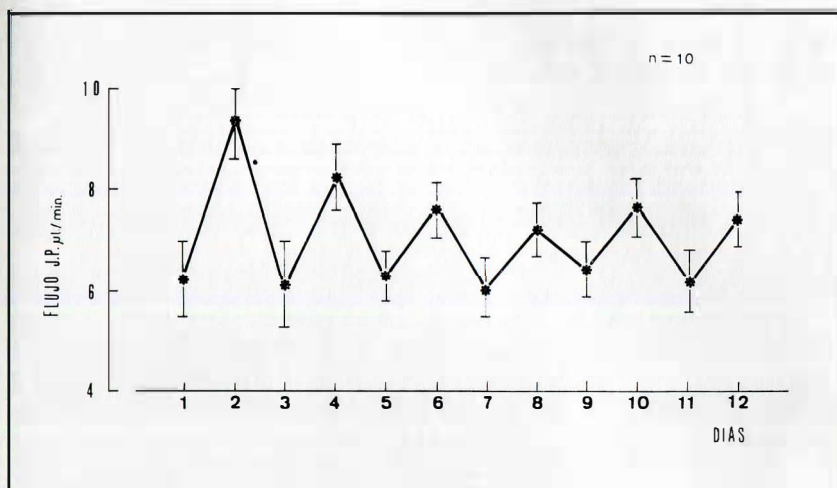


Figura 4.—Variaciones del flujo de jugo pancreático de pollos no anestesiados entre 1 y 12 días después de la intervención. Valores medios \pm S. E. M.

En cuanto a los animales tratados para ser utilizados en experimentos agudos hemos podido comprobar que después de transcurridas varias horas desde que se someten a la segunda intervención (Fig. 5), siguen presentando un flujo de jugo pancreático prácticamente constante ($4,8 \pm 0,6 \mu\text{l}/\text{min.}$, $n = 10$) sin que se presenten problemas de obturación de las cánulas.

Cuando se concluyen estas pruebas de funcionamiento se decapitan los animales y se examina la cavidad abdominal, observándose la buena situación de las cánulas. La bondad de la preparación se confirma tras estudio citológico con microscopio de luz, de cortes semifinos de páncreas fijado "in vivo" e incluidos en plástico. La figura 6 representa dos microfotografías en las que se evidencian los acinos celulares pancreáticos en disposición característica no observándose ninguna anomalía estructural que pueda inducir sospecha de alteración funcional.

A nuestro entender, nuestra fístula pancreática presenta sensibles ventajas con respecto a las hasta ahora descritas en la bibliografía.

En primer lugar, la fístula crónica permite reingresar el jugo pancreático no necesario para los análisis por su vía natural, el

conducto pancreático, con lo que además se evita tener que dañar el duodeno para implantar una fistula de reingreso en el mismo, como hacen Kokue y col. (6).

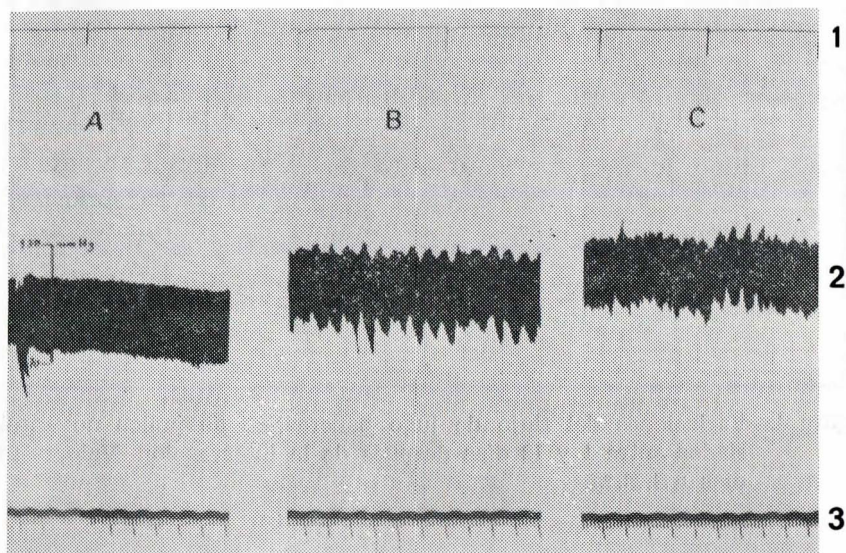


Figura 5.—Registros del flujo de jugo pancreático (1), de la presión arterial (2) y del tiempo (3) en pollo anestesiado transcurridas una hora (A), dos horas (B) y tres horas (C) desde la segunda intervención.

Este reingreso, si bien según Hulan y col. (4) no sería imprescindible para el buen funcionamiento del sistema digestivo del animal, puesto que, al dejar intactos los otros dos conductos pancreáticos presentes en el pollo, dichos autores no observan disminución del peso corporal del animal fistulizado, también es cierto que, según los mismos autores, el flujo de jugo pancreático a través del conducto pancreático principal supone el 90 por 100 de la producción total del páncreas exocrino y puesto que Annis y col. (15) demostraron que cuando el jugo pancreático canino secretado en respuesta a la comida era excluido, el volumen total secretado era significativamente más grande que el obtenido en los casos en que era reingresado, creemos conveniente dicho proceso para un estudio lo más fisiológico posible.

En cuanto al principal problema físico que se presenta en la investigación de la secreción pancreática exocrina en pollos anes-

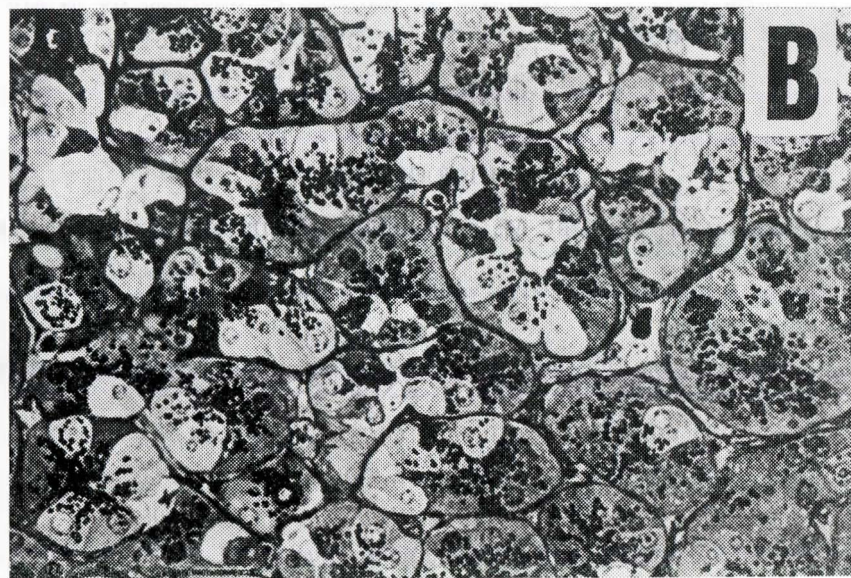


Figura 6.—Microfotografías de páncreas de pollo no operado (A) y de pollo al que se le implantaron las cánulas siete días antes de la obtención de la fotografía (B).

tesiadados, que radica en la aparición de tapones de mucus por la excitación mecánica de la canulación sobre las paredes interiores del conducto pancreático, mucus que llega a obturar el conducto en 30-60 minutos, hecho que fue puesto de manifiesto por Heatley y col. (3) y comprobado posteriormente por otros investigadores (4, 16), hizo que el propio Heatley propusiera un método alternativo de recolección de jugo pancreático directamente del intestino (3), si bien el autor sólo aconsejaba su método para experimentos agudos de corta duración.

Es por ello que proponemos este nuevo método puesto que cuando se va a realizar el experimento agudo ya no es necesario canular el conducto ni manipularlo, y si dicho experimento se lleva a cabo al menos tres días después de la colocación de las cánulas se evita el hecho, citado por Hulan (4) y comprobado por nosotros, de que los volúmenes recolectados de jugo pancreático son, antes de transcurridos estos días, anormales, hecho que tiene en cuenta Kokue (6) cuando deja transcurrir cinco días desde la implantación de sus fístulas crónicas hasta la experimentación, pero no así Caple y col. (2) que miden la secreción pancreática en pollos inmediatamente después de haberse recuperado de la anestesia los animales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ANGELUCCI, L.; BALDIERI, M., y LINARI, G. (1970): *Eur. J. Pharmac.*, 11, 217-232.
- 2.—CAPLE, I. W.; HALPIN, C. G., y HEATH, T. (1978): *Comp. Biochem. Physiol.*, 61 A, 653-659.
- 3.—HEATLEY, N. G.; MCÉLHENY, F., y LEPKOVSKY, S. (1965): *Comp. Biochem. Physiol.*, 16, 29-36.
- 4.—HULAN, W.; MOREAU, G., y BIRD, F. (1972): *Poultry Sci.*, 51, 531-536.
- 5.—IVANOV, N., y GOTEV, R. (1962): *Arch. Tierernähr.*, 12, 65-73.
- 6.—KOKUE, E., y HAYAMA, T. (1972): *Poultry Sci.*, 51, 1366-1370.
- 7.—KOKUE, E., y HAYAMA, T. (1976): *Jap. J. Physiol.*, 26, 1-8.
- 8.—MURILLO, A., y LÓPEZ, M. A. (1971): *Rev. Esp. Fisiol.*, 27, 131-138.
- 9.—NOELTING, G., y BERNFELD, P. (1948): *Herl. Chim. Acta.*, 31, 286-290.
- 10.—HICKSON, J. D. C. (1970): *J. Physiol.*, 206, 2

- 11.—WHEELER, H. O., y MANCUSI-UNGARO, P. L. (1966): *Am. J. Physiol.*, 210, 1153.
- 12.—MURILLO, A., y LÓPEZ, M. A.: Abstracts XIII Reunión de la SECF., Madrid, 1971.
- 13.—VEGA, D. F.; MARTÍNEZ DE VICTORIA, E.; ESTELLER, A., y MURILLO, A. (1977): *Comp. Biochem. Physiol.*, 58A, 259-264.
- 14.—MAÑAS, M. (1973): Memoria de Licenciatura, Universidad de Granada.
- 15.—ANNIS, D., y HALLENBECK, A. (1951): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 77, 383-385.
- 16.—DOCKRAY, G. J. (1975): *J. Physiol.*, 244, 625-637.