

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA

BASES MOLECULARES DE LA DEPLECIÓN DE
GLUTATIÓ Y DE LA NECROSIS CELULAR EN LA
PANCREATITIS AGUDA. PAPEL DE LAS PROTEÍN
QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS

JAVIER PEREDA CERVERA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 29 de Setembre de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Jose Viña Ribes
- D. Daniel Closa Autet
- D. Antonio Manso Martín
- D. Jesus Osada García
- D. Jose Luis Rodríguez García

Va ser dirigida per:

D. Juan Sastre Belloch

D. Gerardo López-Rodas

D. Luis Sabater Ortí

©Copyright: Servei de Publicacions
Javier Pereda Cervera

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6682-0

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA



Bases moleculares de la depleci3n de glutati3n y de la necrosis celular en la pancreatitis aguda. Papel de las prote3n quinasas activadas por mit3genos.

JAVIER PEREDA CERVERA

TESIS DOCTORAL presentada para la obtenci3n del grado de Doctor en Farmacia

Valencia, 2006

A mi familia

A la Pain

AGRADECIMIENTOS

Han sido muchos años de trabajo para la realización de este trabajo y muchas las personas que han contribuido en él. Por eso, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible que llegue este momento.

Quiero agradecer especialmente a mis directores de tesis, Juan, Gerardo y Luis:

A Juan, porque has sido la guía y el alma de esta tesis. Has sido la luz cuando veía las cosas oscuras y me has enseñado a ser científico de la mejor manera. Cada año que ha pasado me ha mostrado tu calidad como persona, tu espíritu de trabajo y tu entusiasmo. Muchas gracias por todo, Juan. Tienes mi más profunda admiración y respeto.

A Gerardo, por tu gran implicación y tus sabios consejos. Por tu paciencia y por abrirme al mundo de la genética de forma tan fascinante. Me he sentido un “cromatina” más en tu laboratorio siempre con tu ayuda. Muchas gracias, Gerardo.

A Luis, porque le das sentido a tanta molécula y a tanto dato. Me has enseñado a sacar la esencia de las cosas y buscar lo importante de la forma más sencilla. El servicio de Cirugía General del Hospital Clínico ha sido una segunda casa para mí. Muchas gracias, Luis.

A Pepe, por acogerme en tu grupo y por enseñarme a pensar como un científico. Echo de menos las reuniones de los viernes, a veces tan terroríficas y a veces tan geniales.

A Fede, por ser tan buena persona, por darle humor a la vida y a los problemas. Has dejado en mí una gran huella. Lástima que no seas un “pancreático”.

A todos los que han trabajado en el grupo de pancreatitis. A Juan Sandoval porque hay mucho de ti en esta tesis, me emocioné cuando defendiste tu tesis. Hemos hecho mucho camino juntos. A Javi Escobar y a Alessandro Arduini, muchas gracias a los dos por vuestra ayuda en esta tesis. Ánimo, y espero poder ayudaros cuando os toque a vosotros. Gracias también a José Luis Rodríguez por sus sabios consejos y las horas trabajadas juntos y a Luis Aparisi por su interés y su visión clínica siempre enriquecedora.

A Lele, (ole, ole!), por ser tan buena amiga en el laboratorio y fuera de él. Gracias por tu trabajo en esta tesis, pero sobre todo gracias por ser como eres. Víctor y tú habéis tratado esta tesis como si fuera vuestra. A Laia, por ayudarme tantas horas y por estar cerca a pesar de estar tan lejos.

Como no, quiero agradecer al resto del laboratorio que tanto han contribuido en esas pequeñas cosas que son tan grandes. Gracias, M. Carmen, has sido un referente para mí en trabajo y dedicación. Gracias por las charlas que hemos tenido juntos. A Ana, que me ha enseñado tantas cosas de la vida y de la ciencia. A Chelo, por su sacrificio continuo. A Diana por su lealtad incondicional, su entusiasmo y su arrojo por la ciencia. Tienes mi admiración y mi amistad. A Soraya por su manera de ver las cosas. A Juan Gambini, Marco y Alfonso por su amistad y por dar un poco de testosterona entre tanto estrógeno. A Jelena, a la que admiro por su valentía y a Nancy que recuerdo con “la rubia tarada”.

Me gustaría hacer un agradecimiento especial al grupo de José Estrela. Muchas gracias, Ángel por los experimentos de confocal, pero sobre todo por tu amistad y compañerismo durante tantos años. A Julián, modelo a seguir, gracias por enseñarme como científico y como persona. ¡Te echo mucho de menos! A María y Salva que contagian con sus ganas de trabajar.

A todos los que pasasteis por el laboratorio. A Gaetano, que diste un toque tan pintoresco al laboratorio. A Teresa, que tanto ha trabajado conmigo codo con codo y tantas horas hemos pasado hablando de la vida. A Natalia y Belén por su ayuda, os deseo mucha suerte. A Rafa por su ayuda con la xantina oxidasa. También quiero recordar a Puri, Juamba y José Antonio. Empecé cuando vosotros acababais y me mostrasteis un mundo por descubrir.

Un beso muy especial para Juana que tanto ayudó al principio de este trabajo. También muchos agradecimientos a las “secres” y en especial para Elena, que tanto nos ha ayudado con las cosas de palacio y nunca han ido despacio. Otro beso para Inma, que alegra tanto las mañanas. Gracias a todas las de la U.C.I. y en especial a Asun, Consuelo, Inma y Luisa. Siempre han ayudado desinteresadamente.

Quiero agradecer a Antonio Alberola su apoyo y ayuda. También quiero recordar a los dos “Luises”, a Isabel y Paqui. Además de trabajar juntos también hemos disfrutado muchas celebraciones juntos.

Gracias a Juan y Concha, y a todos los de Bioquímica, que siempre habéis estado dispuestos a ayudar.

Todos habéis hecho un laboratorio y un departamento muy querido donde trabajar ha sido agradable. Muchos momentos se quedan atrás y los recordaré con mucho cariño.

Gracias al grupo de Pandol en Los Ángeles, y muy en especial a Aure, que tan bien me ha tratado.

No quiero dejar de dar las gracias a toda la gente de Barcelona. En especial muchas gracias a Dani Closa, al que admiro como científico y al que agradezco la oportunidad de hacer una nueva vida en la gran ciudad. Muchas gracias a Ana, que ha sufrido los retrasos de la tesis y de la que he aprendido mucho. También agradecer a Antonio Xaubet, María Molina y Oriol Bulbena por permitirme formar parte de su grupo. Un beso muy grande a todos los del "402".

Muchos amigos he encontrado en el IIBB, y mando un beso especial a Paty, Nacho, María, Gemma, Montse y Emma y a los de neuro, Noe, Judith y Xavi.

En especial, vull agrair a Llorenç, per aquest any que hem viscut junts. M'has obert les teues portes en Barcelona i en Castalla. He apres a ser millor persona amb tu, m'has ensenyat molt de la vida. Et trovaré a faltar molt.

A mis amigos de siempre, Gabi, David, Jorge, Jaime, Pablo, Alex, Carlitos, Iván y Parre, por no dedicarles tanto tiempo como me gustaría. Tenemos mucho que celebrar.

A mi familia, que siempre me apoya. No somos cariñosos pero nos queremos mucho. Aquí en Barcelona os echo mucho de menos. Papá y Mama, gracias por permitirme estudiar, y ayudarme a acabar la tesis. Un abrazo muy grande, hermanitos.

Y por último y con todo mi amor, gracias a ti, Pain. Sé que has visto muchas tesis, pero espero que ésta sea la más especial para ti. Tiene mucho tuyo, tiene tu cariño, tiene tu paciencia, tiene tu trabajo y tiene tu alegría. Has sido la mejor compañera, la mejor amiga y la mejor pareja. Sin ti no sería posible haberla acabado. Gracias por tu infinita ayuda incondicional desde siempre.

INDICE DE FIGURAS	IX
INDICE DE TABLAS	XV
ABREVIATURAS	XVII
I- INTRODUCCIÓN	1
1. PANCREATITIS AGUDA.	3
1.1. Definición.	3
1.2. Epidemiología y etiología.....	6
1.3. Patogenia.	7
1.4. Fisiopatología. Efectos sistémicos de la pancreatitis aguda.	11
1.4.1. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).....	13
1.4.2. Afectación pulmonar en la pancreatitis aguda.....	19
2. CITOQUINAS.	21
2.1. Concepto.	21
2.1.1. Citoquinas proinflamatorias y pancreatitis aguda.....	22
2.1.2. Citoquinas antiinflamatorias y pancreatitis aguda.	24
2.2. Factor de necrosis tumoral α (TNF- α).	25
2.2.1. Estructura y función del TNF- α	25
2.2.2. TNF- α y pancreatitis aguda.....	28
3. RADICALES LIBRES	31
3.1. Concepto de radical libre	31
3.2. Clases de Radicales libres.....	31
3.3. Génesis de las especies reactivas de oxígeno.....	32
3.3.1. Fuentes endógenas	32
3.3.1.1. La cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	32
3.3.1.2. Reacción de Fenton-Haber-Weiss.....	33
3.3.1.3. La xantina óxidoreductasa como fuente de radicales libres.....	34
3.3.1.3.1. Estructura enzimática.....	34
3.3.1.3.2. Conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa.....	35
3.3.1.3.3. Vías metabólicas en las que intervine.	37

3.3.1.3.4. Distribución orgánica, celular y transporte de la xantina oxidasa.	38
3.3.1.3.5. Regulación de la actividad enzimática.....	39
3.3.1.3.6. Xantina oxidasa y pancreatitis aguda.	40
3.3.1.4. Fagocitos activados.	42
3.3.1.5. Otros.	42
3.3.2. Fuentes exógenas.	43
4. ESTRÉS OXIDATIVO	44
4.1. Concepto de estrés oxidativo.....	44
4.2. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas. Índices de estrés oxidativo.	44
4.2.1. Daño oxidativo a lípidos, proteínas, glúcidos y DNA.....	44
4.2.2. Cociente GSSG/GSH como índice de estrés oxidativo.....	46
5. ANTIOXIDANTES	47
5.1. Antioxidantes enzimáticos.	47
5.1.1. Superóxido dismutasas.	47
5.1.2. Glutación peroxidasas.....	48
5.1.3. Catalasa.....	49
5.2. Antioxidantes no enzimáticos	50
5.2.1. El glutatión	50
5.2.1.1. Estructura química del glutatión.....	51
5.2.1.2. Propiedades físico-químicas del glutatión	52
5.2.1.3. Síntesis del glutatión y su regulación.	53
5.2.1.3.1. γ -glutamil cisteína sintetasa.....	54
5.2.1.4. Degradación del glutatión, ciclo del γ -glutamilo.....	55
5.2.1.5. Precursores del glutatión	57
5.2.1.6. Transporte de glutatión	58
5.2.1.7. Localización del GSH.....	60
5.2.1.8. Funciones fisiológicas del GSH	62
5.2.1.9. Papel antioxidante del glutatión: ciclo redox.....	63
5.2.1.10. Glutatión y pancreatitis	64
5.2.2. Otros antioxidantes no enzimáticos.....	66
5.3. Implicación del estrés oxidativo en la fisiopatología de la pancreatitis aguda. .	67

6. PROTEIN-QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAP QUINASAS)	71
6.1. Introducción.	71
6.2. Señales de transducción y control de la expresión génica.....	71
6.2.1. Rutas de señalización intracelular.....	72
6.2.2. Control de la expresión génica.	72
6.2.2.1. Factor Nuclear kappa B (NF-κB)	74
6.2.2.2. SP-1.	74
6.2.2.3. c-Myc.....	74
6.2.2.4. c-Jun.	75
6.3. MAP quinasas	75
6.3.1. ERK 1/2.....	75
6.3.2. JNK	78
6.3.3. p 38	79
6.4. Interacciones entre MAP quinasas	81
6.5. MAP quinasas y pancreatitis aguda.....	82
6.5.1. Activación de las MAP quinasas en células acinares.	83
6.5.2. MAP quinasas en la pancreatitis aguda experimental.	85
7. MUERTE CELULAR.	85
7.1. Necrosis.	88
7.1.1. Mediadores extracelulares, y necrosis.	89
7.1.2. Iones en la necrosis.....	90
7.1.3. Radicales libres en la necrosis.	90
7.1.4. MAP quinasas y necrosis.	90
7.1.5. Mitocondria, Bcl-2 y necrosis.....	91
7.1.6. Proteínas de choque térmico, proteasas, nucleasas y fosfolipasas en la necrosis.....	92
7.2. Apoptosis.	92
7.2.1. Caspasas y apoptosis.....	93
7.2.2. Mitocondria y apoptosis.....	94
7.3. Apoptosis y Necrosis en la pancreatitis aguda.....	95
II- OBJETIVOS	97
III- MATERIALES Y MÉTODOS	101

1. MATERIALES.	103
1.1. Animales de experimentación.....	103
1.2. Aparatos.	103
1.3. Reactivos.	106
2. MÉTODOS.	107
2.1. Modelo experimental de pancreatitis aguda necrótica.	107
2.1.1. Descripción del modelo.	107
2.1.2. Diseño del estudio de la pancreatitis aguda necrótica.	109
2.1.2.1. Grupos de estudio para conocer la cinética de la depleción de glutatión, de la regulación de la expresión génica de la γ -glutamil cisteína sintetasa y de la activación de las MAP quinasas en la pancreatitis aguda experimental necrótica.	109
2.1.2.2. Grupos de estudio para conocer el efecto del tratamiento con oxipurinol y pentoxifilina sobre la activación de las MAP quinasas.....	110
2.2. Modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína.	111
2.2.1. Descripción del modelo.	111
2.2.2. Diseño del estudio de la pancreatitis aguda inducida con ceruleína.....	112
2.2.2.1. Grupos de estudio con ratas para conocer la regulación génica y expresión de la GCS.	112
2.2.2.2. Grupos de estudio con ratones deficientes en el del TNF- α o en el receptor 2 del TNF- α	112
2.2.2.3. Grupos de estudio con ratones deficientes en TNF- α	113
2.3. Aislamiento y cultivo de células acinares de páncreas de rata.	113
2.3.1. Fundamento.....	113
2.3.2. Reactivos.	114
2.3.2.1. Tampón de digestión:	114
2.3.2.2. Medio de cultivo:	115
2.3.3. Procedimiento.....	115
2.3.4. Diseño del estudio con células acinares de páncreas de rata.	116
2.4. Cultivos celulares de células AR42J.....	117
2.4.1. Fundamento.....	117

2.4.2. Condiciones de cultivo.....	117
2.4.3. Procedimiento.....	118
2.4.4. Diseño del estudio con células AR42J.....	119
2.4.4.1. Incubaciones para conocer el efecto del taurocolato sobre el nivel de glutatión en células AR42J.	119
2.4.4.2. Incubaciones para conocer el efecto de la inhibición de las MAP quinasas sobre el nivel de glutatión tras la incubación con taurocolato en células AR42J.	119
2.4.4.3. Incubaciones para conocer los efectos de la inhibición de las proteasas sobre el nivel de glutatión tras la incubación con taurocolato en células AR42J.	119
2.4.4.4. Incubaciones para conocer el papel del calcio, del proteasoma y de la GGT en la depleción de glutatión tras la incubación con taurocolato en células AR42J.	120
2.5. Determinación de proteínas.....	120
2.5.1. Fundamento.....	120
2.5.2. Procedimiento.....	120
2.5.3. Cálculos.....	121
2.6. Determinación de glutatión reducido.....	121
2.6.1. Fundamento.....	121
2.6.2. Procedimiento.....	121
2.6.3. Cálculo.....	122
2.7. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa.....	122
2.7.1. Fundamento.....	122
2.7.2. Procedimiento.....	123
2.7.3. Cálculos.....	123
2.8. <i>Western Blot</i>	123
2.8.1. Fundamento.....	123
2.8.2. Condiciones del gel y transferencia.....	124
2.8.3. Visualización.....	125
2.8.4. Cuantificación de los resultados.....	127
2.9. Aislamiento de RNA.....	127

2.10. Retrotranscripción-Amplificación del RNA (RT-PCR).....	127
2.10.1. Fundamento.....	127
2.10.2. Retrotranscripción del RNA total.	127
2.10.3. Análisis del RNA total retrotranscrito por PCR cuantitativo.....	127
2.11. Inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP).	128
2.11.1. Fundamento.....	128
2.11.2. Procedimiento.....	128
2.11.2.1. Preparación de núcleos en tejido pancreático de rata.	129
2.11.2.2. Fragmentación de la cromatina entrecruzada.	129
2.11.2.3. Cuantificación del DNA.....	130
2.11.2.4. Inmunoprecipitación de la cromatina.....	131
2.11.2.5. Análisis por PCR del DNA inmunoprecipitado.....	132
2.12. RNAPol-ChIP.....	133
2.13. Estudios mediante microscopía confocal.	134
2.13.1. Fundamento.....	134
2.13.2. Procedimiento y diseño del estudio.....	136
2.13.2.1. Estudio de los niveles de glutatión en acinos pancreáticos.	136
2.13.2.2. Estudio de los niveles de glutatión y del tipo de mortalidad celular en células AR42J.....	136
2.14. Análisis estadístico.	137
IV- RESULTADOS	139
1. EVOLUCIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN PÁNCREAS EN EL CURSO DE LA PANCREATITIS AGUDA NECRÓTICA.	141
2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA γ-GLUTAMIL CISTEÍNA SINTETASA EN LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL NECRÓTICA.	142
2.1. Expresión de la γ -glutamyl cisteína sintetasa en la pancreatitis aguda necrótica.	142
2.2. Unión de la ARN polimerasa a la región codificante del gen de la γ -glutamyl cisteína sintetasa en cabeza del páncreas en la pancreatitis aguda necrótica.	145
2.3. Unión de factores de transcripción a los promotores de la γ -glutamyl cisteína sintetasa en la pancreatitis aguda necrótica.	146
2.4. Expresión de la proteína de la γ -glutamyl cisteína sintetasa en páncreas en el curso de la pancreatitis aguda necrótica.....	148

3. NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN PÁNCREAS EN LA PANCREATITIS AGUDA EDEMATOSA EN RATAS.	149
4. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA γ-GLUTAMIL CISTEÍNA SINTETASA EN LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL EDEMATOSA.	150
4.1. Expresión de la γ -glutamyl cisteína sintetasa en la pancreatitis aguda edematosa.	150
4.3. Unión de factores de transcripción al promotor de la subunidad catalítica de la γ -glutamyl cisteína sintetasa.....	151
5. FOSFORILACIÓN DE LAS MAP QUINASAS EN LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL NECRÓTICA.	152
5.1. Evolución de la fosforilación de ERK en páncreas durante la PA necrótica.	152
5.2. Evolución de la fosforilación de JNK en páncreas durante la PA necrótica.....	154
5.3. Evolución de la fosforilación de p38 en páncreas durante la PA necrótica.....	156
6. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PENTOXIFILINA Y OXIPURINOL SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LAS MAP QUINASAS EN PÁNCREAS EN LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL NECRÓTICA.	158
6.1. Efecto de la pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de ERK en páncreas en la pancreatitis aguda experimental necrótica.....	158
6.2. Efecto del tratamiento con pentoxifilina, oxipurinol sobre la fosforilación de JNK en páncreas en la pancreatitis aguda necrótica.....	160
6.3. Efecto del tratamiento con pentoxifilina, oxipurinol sobre la fosforilación de p38 en páncreas en la pancreatitis aguda necrótica.....	162
7. PAPEL DEL TNF-α EN LA DEPLECIÓN DE GLUTATIÓN PANCREÁTICO EN LA PANCREATITIS AGUDA.	164
8. EFECTO DEL TAUROCOLATO SOBRE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN ACINOS PANCREÁTICOS AISLADOS. PAPEL DE LAS MAP QUINASAS Y DE LAS PROTEASAS.	166
9. DEPLECIÓN DE GLUTATIÓN CAUSADA POR TAUROCOLATO EN CÉLULAS ACINARES AR42J. PAPEL DE LAS MAP QUINASAS Y DE LAS PROTEASAS. ..	170
9.1. Caracterización de los niveles de glutatión en células acinares AR42J. Efecto del taurocolato.	170
9.2. Efecto de la inhibición de las MAP quinasas en la depleción de glutatión producida por taurocolato en células AR42J.....	173
9.3. Efecto de la inhibición de proteasas en la depleción de glutatión producida por el taurocolato en células AR42J.....	176
9.4. Papel del calcio y de la γ -glutamyl transpeptidasa sobre la depleción de glutatión causada por taurocolato en células AR42J.....	178

9.5. Efecto del glutatión monoetil éster sobre la depleción de glutatión producida por taurocolato en células AR42J.	179
10. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR Y DEL TIPO DE MORTALIDAD EN CÉLULAS AR42J INCUBADAS CON TAUROCOLATO.	180
V- DISCUSIÓN	185
1. MODELOS EXPERIMENTALES DE PANCREATITIS AGUDA.	187
2. ESTRÉS OXIDATIVO Y PANCREATITIS AGUDA.	190
3. DEPLECIÓN DE GLUTATIÓN Y PANCREATITIS AGUDA.	192
3.1. Déficit de síntesis de glutatión en la pancreatitis aguda severa.	194
3.2. MAP quinasas y depleción de glutatión en la pancreatitis aguda.	195
3.3. Proteasas y depleción de GSH inducida por taurocolato.	201
3.4. Depleción de glutatión y muerte celular inducida por taurocolato.	204
VI- CONCLUSIONES	207
VII- BIBLIOGRAFIA	211

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	Localización del páncreas.....	3
Figura 2.-	Teoría de la colocalización enzimática como fenómeno iniciador de la pancreatitis aguda.	10
Figura 3.-	Papel de los diferentes mediadores de la inflamación en la fisiopatología de la PA.	15
Figura 4.-	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).....	17
Figura 5.-	Receptores de TNF- α y mecanismo de acción intracelular.	27
Figura 6.-	Representación gráfica de los enlaces del átomo de molibdeno.	35
Figura 7.-	Conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa.....	36
Figura 8.-	Vía de degradación de las purinas.	37
Figura 9.-	Sistemas antioxidantes celulares.....	50
Figura 10.-	Estructura química del glutatión reducido.	51
Figura 11.-	Estructura química del glutatión oxidado.....	52
Figura 12.-	Ciclo del γ -glutamilo.....	56
Figura 13.-	Ciclo redox del glutatión.....	64
Figura 14.-	Vía de señalización de ERK.....	77
Figura 15.-	Vía de señalización de JNK.	79
Figura 16.-	Vía de señalización de p38.	82
Figura 17.-	Inducción de pancreatitis con taurocolato: Material necesario.	108
Figura 18.-	Inducción de pancreatitis con taurocolato: Preparación del animal.	108
Figura 19.-	Inducción de pancreatitis con taurocolato: Canulación del conducto biliopancreático para la perfusión del taurocolato.	108
Figura 20.-	Inducción de pancreatitis con taurocolato: Clampaje proximal del conducto biliopancreático para evitar el reflujo de taurocolato hacia el hígado.	108
Figura 21.-	Inducción de pancreatitis con taurocolato: Se observan áreas de necrosis en el páncreas tras la perfusión con taurocolato..	108

Figura 22.- Canulación de la vena femoral para la administración de los tratamientos de oxipurinol y pentoxifilina	108
Figura 23.- Esquema de la inducción de pancreatitis con ceruleína.	111
Figura 24.- Esquema de la técnica de <i>western blotting</i>	126
Figura 25.- Evolución de los niveles de glutatión reducido (GSH) en páncreas tras la inducción de pancreatitis aguda por taurocolato.	141
Figura 26A.- RT-PCR del gen de la subunidad catalítica de la γ -glutamil cisteína sintetasa (GCS) en la cabeza y en la cola del páncreas.....	142
Figura 26B.- Variación de la fluorescencia frente al número de ciclos de amplificación de la RT-PCR de la GCS.	143
Figura 26C.- Curva de fusión de los fragmentos amplificados en la RT-PCR de la GCS	143
Figura 27A.- RT-PCR del gen de la subunidad reguladora de la GCS en la cabeza y la cola del páncreas	144
Figura 27B.- Variación de la fluorescencia frente al número de ciclos de amplificación de la RT-PCR de la GCS.	144
Figura 27C.- Curva de fusión de los fragmentos amplificados en la RT-PCR de la GCS	144
Figura 28A.- PCR con primers específicos del exón de la subunidad catalítica de la GCS de inmunoprecipitados obtenidos utilizando anticuerpos contra la ARN polimerasa II.	145
Figura 28B.- PCR con primers específicos del exón de la subunidad reguladora de la GCS de inmunoprecipitados obtenidos utilizando anticuerpos contra la ARN polimerasa II	146
Figura 29A.- Unión de factores transcripcionales al promotor del gen de la subunidad catalítica de la GCS.....	147
Figura 29B.- Unión de factores transcripcionales al promotor del gen de la subunidad reguladora de la GCS.	147
Figura 30A.- Niveles de la proteína GCS en páncreas durante la pancreatitis aguda.	148
Figura 30B.- Densitometría de los <i>western blots</i> de la GCS	148
Figura 31.- Niveles de glutatión reducido (GSH) en páncreas tras la inducción de pancreatitis aguda por ceruleína en ratas..	149
Figura 32.- RT-PCR del gen de la subunidad catalítica de la GCS en la cabeza del páncreas.....	150

Figura 33.- Unión de factores transcripcionales al promotor del gen de la subunidad catalítica de la GCS.....	151
Figura 34A.- Evolución de la fosforilación de ERK 1 y ERK 2 en páncreas durante la pancreatitis aguda.....	152
Figura 34B.- Densitometría de la cinética de la fosforilación de ERK 1 (p44) en páncreas durante la pancreatitis aguda.	153
Figura 34C.- Densitometría de la cinética de la fosforilación de ERK 2 (p42) en páncreas durante la pancreatitis aguda.....	153
Figura 35A.- Evolución de la fosforilación de JNK en páncreas durante la pancreatitis aguda.....	154
Figura 35B.- Densitometría de la cinética de la fosforilación de JNK 1 (p54) en páncreas durante la pancreatitis aguda.....	155
Figura 35C.- Densitometría de la cinética de la fosforilación de JNK 2 (p46) en páncreas durante la pancreatitis aguda.....	155
Figura 36A.- Evolución de la fosforilación de p38 en páncreas durante la pancreatitis aguda.....	156
Figura 36B.- Densitometría de la cinética de la fosforilación de p38 en páncreas durante la pancreatitis aguda.....	157
Figura 37A.- Efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de ERK 1/2 en páncreas a los 30 minutos de la inducción de la pancreatitis aguda con taurocolato.	158
Figura 37B.- Densitometría del efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de ERK 1 (p44) en páncreas a los 30 minutos de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato.	159
Figura 37C.- Densitometría del efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de ERK 2 (p42) en páncreas a los 30 minutos de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato.	159
Figura 38A.- Efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de JNK en páncreas a los 30 minutos de la inducción de la pancreatitis aguda con taurocolato.	160
Figura 38B.- Densitometría del efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de JNK 1 (p54) en páncreas a los 30 minutos de la inducción de pancreatitis con taurocolato.....	161
Figura 38C.- Densitometría del efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de JNK 2 (p46) en páncreas a los 30 minutos de la inducción de pancreatitis con taurocolato.....	161

Figura 39A.- Efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de p38 en páncreas a los 30 minutos de la inducción de la pancreatitis aguda con taurocolato.....	162
Figura 39B.- Densitometría del efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de p38 en páncreas a los 30 minutos de la inducción de pancreatitis con taurocolato.....	163
Figura 40.- Niveles de glutatión reducido en páncreas de ratones controles (WT) y deficientes en el receptor 1 del TNF- α (KO-RT1) y en el receptor 2 del TNF- α (KO-RT2) tras la administración de suero salino o tras la administración de ceruleína.....	164
Figura 41.- Niveles de glutatión reducido en ratones controles (WT) y deficientes en TNF- α (KO-TNF- α) en páncreas tras la administración de suero salino o tras la administración de ceruleína.	165
Figura 42.- Efectos del taurocolato y de inhibidores de las rutas de las MAP quinasas e inhibidores de proteasas sobre los niveles de glutatión reducido en acinos pancreáticos aislados.....	166
Figura 43A.- Efecto del taurocolato sobre los niveles de glutatión reducido medido en células acinares de páncreas mediante microscopía confocal y su modulación por la vía de ERK.....	167
Figura 43B.- Cuantificación de los niveles de glutatión en células acinares de páncreas medidos mediante microscopía confocal utilizando monoclorobimano como fluorocromo. Efectos del taurocolato y de la inhibición de la vía de ERK.....	168
Figura 44A.- Fosforilación de ERK 1/2 en el proceso de aislamiento de acinos pancreáticos.	168
Figura 44B.- Fosforilación de JNK en el proceso de aislamiento de acinos pancreáticos.	169
Figura 45.- Variación del contenido de glutatión en las células AR42J tras sucesivos pases posteriores a la descongelación de las células.	170
Figura 46.- Curva dosis-respuesta de los niveles de glutatión reducido en células AR42J incubadas con taurocolato.	171
Figura 47.- Evolución de los niveles de glutatión reducido en células AR42J incubadas con una concentración de 0,5% de taurocolato.....	172
Figura 48.- Niveles de glutatión reducido en células AR42J incubadas durante una hora con una concentración de taurocolato de 0,5% y en presencia de diferentes inhibidores de las MAP quinasas.....	174

Figura 49A.- Western blot de un gel representativo de la fosforilación de ERK en células AR42J incubadas con taurocolato al 0,5% durante 1 hora y de su inhibición mediante inhibidores específicos	175
Figura 49B.- Densitometría de la fosforilación de ERK 1 (izquierda) y de ERK 2 (derecha) en células AR42J incubadas con mediante taurocolato al 0,5% durante 1 hora y de su inhibición mediante inhibidores específicos.....	175
Figura 50.- Niveles de glutatión reducido (GSH) en células AR42J incubadas durante 1 h con taurocolato 0,5% y con diferentes inhibidores de proteasas.....	176
Figura 51.- Niveles de glutatión reducido (GSH) en células AR42J incubadas durante 1 h con taurocolato 0,5% y con inhibidores de proteasas lisosomales (monensina y 3-metiladenina) y del proteasoma (lactacistina)	177
Figura 52.- Niveles de glutatión reducido en células AR42J incubadas durante 1 h con taurocolato 0,5% (Tau), con quelante de calcio (BAPTA), y con inhibidor de γ-glutamyl transpeptidasa (acivicina).....	178
Figura 53.- Niveles de glutatión reducido en células AR42J incubadas durante una hora con taurocolato al 0,5% y con diferentes concentraciones de glutatión monoetil éster.....	179
Figura 54.- Liberación de LDH al medio de cultivo tras el tratamiento de las células AR42J con taurocolato al 0,5% durante 1 h y con el inhibidor AEBSF.....	180
Figura 55.- Cantidad de proteína en placa después de la incubación de las células AR42J con taurocolato 0,5% durante 1 h y con el inhibidor AEBSF.....	181
Figura 56.- Imagen de las células AR42J mediante microscopía confocal sin utilizar fluorocromos.....	182
Figura 57A.- Efectos del taurocolato y del AEBSF sobre los niveles de glutatión en células AR42J medidos mediante microscopía confocal utilizando monoclorobimano como fluorocromo específico.	182
Figura 57B.- Efectos del taurocolato y del AEBSF sobre el tipo de muerte celular en células AR42J estudiado mediante microscopía confocal utilizando fluorocromos específicos de necrosis (ioduro de propidio) y de apoptosis (anexina V).	183

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Enumeración de los criterios clínicos del SRIS.	13
Tabla 2.- Ligandos y receptores capaces de inducir muerte por necrosis.....	89
Tabla 3.- Descripción de los anticuerpos utilizados para <i>western blotting</i>	126
Tabla 4.- Condiciones de amplificación en la RT-PCR.....	128
Tabla 5.- Oligonucleótidos específicos utilizados para la RT-PCR.	128
Tabla 6.- Anticuerpos utilizados en los ensayos de ChIP.	131
Tabla 7.- Condiciones de amplificación en el ChIP.	133
Tabla 8.- Oligonucleótidos específicos utilizados para los ensayos de ChIP.	133
Tabla 9.- Oligonucleótidos específicos utilizados para los ensayos de RNAPol-ChIP.....	134

ABREVIATURAS

- AEBSF: fluoruro de 4-(2-aminoetil)- sulfonil benceno.
- AMPc: monofosfato de adenosina cíclico.
- AP-1: proteína activadora 1.
- APACHE: *acute physiology and chronic health evaluation*.
- Apaf-1: factor de activación de proteasas apoptóticas.
- ARN Pol II: ARN polimerasa II.
- ATCC: *American type cell culture*.
- ATF-2: factor activador de la transcripción.
- ATP: trifosfato de adenosina.
- BAPTA-AM: ester de 1,2-bis(2-amino-5-fluorofenoxy)etano-*N,N,N',N'*-ácido tetraacético tetrakis (acetoximetil).
- Bax: proteína X asociada a Bcl-2.
- Bcl-2: proteína del linfoma de célula B 2.
- BH3: proteína con dominio homólogo a BCL-2 3.
- Bid: agonista del dominio de muerte que interacciona con Bcl-2.
- Bim: mediador de muerte celular que interacciona con Bcl-2.
- BSA: albúmina de suero bovino.
- CCK: colecistoquinina.
- CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.
- c-FLICE: enzima convertidora de interleuquina 1 beta tipo FADD.
- ChIP: inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina.
- CID: coagulación intravascular diseminada.
- CK2: caseína quinasa 2.
- DHLA: ácido dihidrolipoico.
- DNA: ácido desoxirribonucleico.
- DNAsas: desoxirribonucleasas.
- ECTA: enzima convertidora del TNF- α .
- EDTA: ácido etilendiaminetetraacético, sal disódica.
- EF2: péptido de elongación 2.
- ERK: quinasa regulada por señales extracelulares.
- ERN: especies reactivas de nitrógeno.
- ERO: especies reactivas de oxígeno.
- FADD: proteína asociada al dominio de muerte.
- GCS: γ -glutamil cisteína sintetasa.
- GGT: γ -glutamil transpeptidasa.
- GM-CSF: factor estimulador de colonias – granulocito macrófago.
- GSH: glutatión reducido.
- GSSG: glutatión oxidado.
- H.P.L.C: cromatografía líquida de alta resolución.
- HRP: peroxidasa de rábano.

- Hsp: proteínas de choque térmico.
- HtrA2: proteasa A2 con requerimiento alto de temperatura.
- IAPs: proteínas inhibidoras de la apoptosis.
- ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1.
- IFN- λ : interferón gamma.
- IFN- γ : interferón- γ .
- IgM : inmunoglobulina M.
- I κ B: inhibidor de NF- κ B.
- IL: interleuquina.
- IP: inmunoprecipitado.
- JAK: quinasa Janus.
- JNK: quinasa del NH₂ terminal de c-Jun.
- kD: kilodalton.
- L_B: linfocitos B.
- LBA: lavado broncoalveolar.
- LDH: lactato deshidrogenasa.
- Linfocito T_{H2}: linfocito T colaborador tipo 2.
- LPS: lipopolisacárido.
- L_T: linfocitos T.
- MAP quinasas: proteín quinasas activadas por mitógenos.
- MAPKK o MEK: MAP quinasa quinasa.
- MAPKKK o MEKK: MAP quinasa quinasa quinasa.
- MCF-7: fibroblastos de adenocarcinoma mamario 7.
- Mcl-1: célula de leucemia mieloide.
- MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos.
- MDA: dialdehído malónico.
- MEF: factor estimulador de miocitos.
- MEK: ERK quinasa.
- MIP: proteína inflamatoria de macrófagos.
- MKK: proteínas activadas por mitógenos quinasa quinasa.
- Mo: molibdopterina.
- MPO: mieloperoxidasa.
- mRNA: RNA mensajero.
- NAC: N-acetilcisteína.
- NAD: dinucleótido de adenina y nicotilamida.
- NADH: forma reducida del dinucleótido de adenina y nicotilamida.
- NADP: fosfato del dinucleótido de adenina y nicotilamida.
- NADPH: forma reducida del fosfato del dinucleótido de adenina y nicotilamida.
- NF- κ B: factor nuclear kappa B.
- NFAT: factores nucleares en células T activadas.
- NGF: factor de crecimiento de los nervios.
- NK: *natural killer*.
- NO: óxido nítrico.
- PA: pancreatitis aguda.

- PAF: péptido activador de plaquetas.
- PAK: proteína relacionada con la quinasa p21 activada.
- PARS: polimerasas de poli (ADP-ribosa).
- PBS: tampón fosfato salino.
- PCA: ácido perclórico.
- PCR: proteína C reactiva.
- PDF: productos de degradación del fibrinógeno.
- PL: plasma.
- PLA₂: fosfolipasa A₂.
- PMSF: fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.
- Puma *p53 up-regulate modulator of apoptosis*.
- qRT-PCR: transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
- Ras: secuencias de DNA asociadas a retrovirus.
- RER: retículo endoplasmático rugoso.
- RNA: ácido ribonucleico.
- RNAPol-ChIP: inmunoprecipitación de la cromatina unida a la RNA polimerasa.
- RNAsa: ribonucleasa.
- RT-PCR: transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa.
- SDRA: síndrome del distress respiratorio del adulto.
- SDS: dodecil sulfato sódico.
- SDS PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.
- SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- sistema ASC: sistema de transporte de aminoácidos para la alanina, serina y cisteína.
- Smac/DIABLO: segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/ proteína de unión directa a IAP con bajo punto isoeléctrico.
- SMAD: *similar to the mothers against decapentaplegic*.
- SOD: superóxido dismutasa.
- SP-1: proteína estimuladora 1
- SRIS: respuesta inflamatoria sistémica.
- STAT: señales de transducción y de activadores de la transcripción.
- sTNF- α R: receptor soluble del TNF- α .
- TAC: tomografía axial computarizada.
- TBE: tampón tris-borato.
- TGF- β : factor de transformación de crecimiento β .
- TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral α .
- TNF- α : factor de necrosis tumoral α .
- TRAIL: ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF- α .
- tRNA: ácido ribonucleico transferente.
- TxA₂: tromboxano A₂.
- VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1.
- XDH: xantina deshidrogenasa.
- XO: xantina oxidasa.
- XOR: enzima xantina óxidoreductasa.

I-INTRODUCCIÓN

1. PANCREATITIS AGUDA.

1.1. Definición.

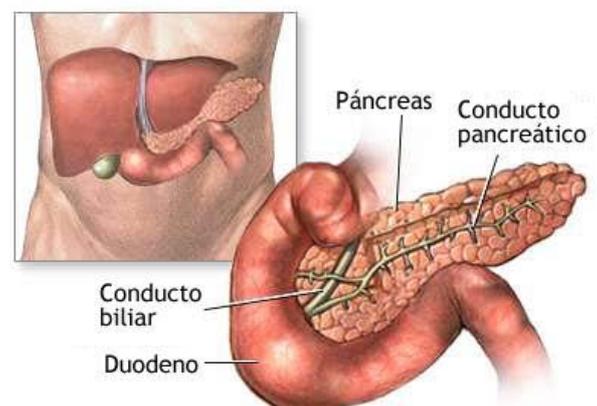
El páncreas es un órgano que muestra una longitud que varía entre 15-25 cm y que pesa entre 70 y 150 g en el adulto. Está localizado en el retroperitoneo, en íntimo contacto con otros órganos como el estómago en su porción superior, el duodeno al cual está unido, el bazo en la zona de la cola, el colon transverso por delante y el riñón y la glándula suprarrenal izquierdos (figura 1).

Ejerce una doble función, endocrina y exocrina. Se comporta como una glándula endocrina puesto que posee un 1-2% de células capaces de secretar hormonas en un páncreas adulto, la mayor parte dispuestas en los islotes de Langerhans. El páncreas endocrino está formado en un 60-75% por células β que segregan insulina y en un 20-25% por células α que segregan glucagón. El resto son células γ y pp que segregan somatostatina y péptido pancreático respectivamente. La mayor parte del parénquima pancreático está compuesto por células acinares que se encargan de la secreción de enzimas digestivas, que mediante conductos van a parar al intestino para ayudar a digerir los alimentos.

La diferenciación histológica y funcional de la glándula pancreática permite la clasificación de su patología según se afecte la parte endocrina o exocrina. Entre los procesos patológicos que afectan a la parte endocrina, destaca la alteración de las células β que es la causante de la diabetes mellitus. Las enfermedades que afectan la parte exocrina sobre todo son de tipo inflamatorio y tumoral. Dentro de la patología inflamatoria, por su frecuencia y repercusión, destaca la pancreatitis aguda sobre la crónica.

Los procesos inflamatorios del páncreas están desencadenados por diversos factores etiológicos, algunos de los cuales pueden dar lugar tanto a pancreatitis aguda como crónica. La pancreatitis aguda (PA) es una enfermedad en la que el espectro clínico varía ampliamente. Mientras que en la mayoría de las ocasiones la enfermedad es leve, de curso autolimitado y mejora en pocos

Figura 1.- Localización del páncreas.



días con medidas terapéuticas sintomáticas, en otras ocasiones evoluciona de forma fulminante como un cuadro de extrema gravedad y resistente a todo tipo de tratamientos. Esta variabilidad en la presentación, en la etiología y en la evolución clínica de la PA ha dificultado su estudio. Tras la primera descripción de la pancreatitis aguda por Fitz en 1889 ha habido muchos intentos de clasificación de la enfermedad, basándose al principio en criterios post-mortem o por hallazgos operatorios.

Desde 1963 se ha tratado de unificar criterios de diagnóstico, pronóstico, severidad y manejo de los pacientes con pancreatitis, realizando numerosas reuniones multidisciplinarias de consenso que han incluido profesionales de todas las ramas de la salud y la medicina. Aunque con posterioridad a la reunión de Atlanta (Bradley, 1993) se han identificado defectos menores o situaciones que no quedan bien reflejadas (Dervenis, 2000; Uhl y cols., 2002), sus definiciones, criterios y clasificación siguen vigentes actualmente:

Pancreatitis aguda: proceso inflamatorio agudo del páncreas, con afectación variable de otros tejidos regionales y sistemas orgánicos alejados. Se manifiesta por la aparición súbita de dolor abdominal acompañado con frecuencia por vómitos, fiebre, taquicardia, leucocitosis, así como elevación de las enzimas pancreáticas en sangre y/u orina. Histológicamente sus hallazgos varían desde la aparición microscópica de edema intersticial y necrosis grasa del parénquima pancreático, a extensas áreas macroscópicas de necrosis y hemorragia pancreática y peripancreática.

Se diferencia la pancreatitis aguda leve de la pancreatitis aguda grave.

Pancreatitis aguda leve: pancreatitis aguda asociada a una ligera alteración orgánica, con recuperación completa y ausencia de fallo multiorgánico o complicaciones sistémicas o locales. Histológicamente se presenta como edema intersticial, pudiendo encontrarse áreas microscópicas de necrosis glandular. Constituye aproximadamente el 75% de los casos de la práctica clínica y su mortalidad oscila entre el 0-5% (Beckingham y Bornman, 2001).

Pancreatitis aguda grave: pancreatitis aguda que en su evolución se asocia con la aparición de fallo multiorgánico y/o complicaciones sistémicas y/o complicaciones locales. Histológicamente se pueden apreciar áreas de necrosis y hemorragia pancreática y peripancreática, que se han relacionado directamente con la aparición de las complicaciones que van a determinar la gravedad y el pronóstico de la enfermedad (Schölmerich y cols., 1993).

Para intentar objetivar la gravedad de la PA se emplean clasificaciones pronósticas como la de Ranson que son útiles tras las 48 h del inicio de la enfermedad (Ranson y cols., 1974) o la evaluación APACHE II que puede utilizarse en cualquier momento del desarrollo de la enfermedad (Larvin y

McMahon, 1989). La PA grave se presenta con una frecuencia aproximada del 25% y una mortalidad que varía entre el 10-45% (Beckingham y Bornman, 2001).

Fallo multiorgánico (presencia de dos o más de los siguientes factores):

Shock: tensión arterial sistólica < 90 mm Hg.

Insuficiencia respiratoria: presión arterial de oxígeno < 60 mm Hg.

Insuficiencia renal: creatinina > 177 $\mu\text{mol/l}$ o 2 mg/dl tras rehidratación.

Hemorragia digestiva: > 500 ml/24 horas.

Complicaciones sistémicas:

Coagulación intravascular diseminada (CID):

Plaquetas < 100 000/mm³

Fibrinógeno < 80 $\mu\text{g/ml}$.

Productos de degradación del fibrinógeno (PDF) > 80 $\mu\text{g/ml}$.

Alteraciones metabólicas severas:

Calcemia < 1.87 mmol/L o 7.5 mg/dl.

Complicaciones locales:

Necrosis pancreática: área local o difusa de parénquima pancreático no viable, asociado de forma característica a necrosis grasa peripancreática. La tomografía axial computarizada (TAC) con contraste intravenoso es la exploración más apropiada para su evaluación (Clavien y cols., 1988), considerándose criterio diagnóstico de necrosis la presencia de zonas bien delimitadas de parénquima pancreático no realizadas tras la administración del contraste (focales o difusas, que midan más de tres centímetros o que afecten a más del 30% del páncreas) (Balthazar y cols., 1990). La sensibilidad de esta exploración para el diagnóstico de necrosis es superior al 90%, por lo cual está considerada como el patrón de referencia para la valoración de esta complicación (Bradley y cols., 1989). Macroscópicamente se aprecian áreas de tejido pancreático desvitalizado y necrosis grasa peripancreática, bien superficiales y dispersas o bien profundas y confluentes. Microscópicamente se caracteriza por una extensa necrosis grasa intersticial, lesiones vasculares y necrosis del parénquima que afecta a las células acinares, a los islotes y a los conductos pancreáticos.

Colección fluida aguda: acumulación de líquido en o cerca del páncreas que aparece de forma temprana en el curso de la PA. De forma característica carece de una pared de tejido fibroso o de granulación que la delimite, lo que la diferencia del absceso y el pseudoquiste pancreático. La mayor parte evoluciona

hacia su reabsorción espontánea, aunque puede progresar a pseudoquiste (si se cronifica) o a absceso (si se infecta).

Abceso pancreático: colección de pus intraabdominal, generalmente localizada en la proximidad del páncreas y que contiene poca o ninguna necrosis pancreática. Clínicamente se presenta como un proceso infeccioso tardío en el curso de la PA, habitualmente 4 semanas o más tras el inicio.

Pseudoquiste pancreático: colección de jugo pancreático limitada por una pared de tejido fibroso o de granulación. De forma ocasional se hace palpable a la exploración abdominal y su característica más importante es la presencia de una pared bien definida observable mediante ecografía o TAC. Esta complicación requiere al menos un periodo de tiempo de 4 o 6 semanas desde el inicio de la PA.

1.2. Epidemiología y etiología.

La pancreatitis aguda es una enfermedad de gran importancia debido a su frecuencia relativamente alta, y a una incidencia creciente en nuestros días. A pesar de las dificultades de ratificar los estudios epidemiológicos por las variaciones geográficas, los métodos de diagnóstico y la contabilización de brotes repetidos, se puede concluir que en los grandes hospitales entre el 0.15 y el 3% de los pacientes atendidos en urgencias sufren pancreatitis aguda (Neoptolemos y cols., 1998; Banks, 2002). De acuerdo con la Organización Mundial de Gastroenterología sobre la base de 6000 episodios de dolor abdominal agudo, el 2.3% son debidos a la enfermedad pancreática aguda y puede alcanzar el 1% de la mortalidad hospitalaria (Banks, 2002).

Es destacable que la frecuencia está aumentando durante los últimos años. En un estudio reciente que abarca 5312 pacientes en Gran Bretaña, se concluye que la incidencia se ha doblado en los últimos 30 años.

En España, del total de urgencias médicas se calcula que del 0.2-0.6% son pancreatitis aguda y suponen del 0.7 al 4% de los ingresos hospitalarios (Aparisi y Raga, 1991). La incidencia media en los países de la Unión Europea es de 380 casos/10⁶ habitantes / año (Neoptolemos y cols., 1998). España tiene una incidencia de 350 casos/10⁶ habitantes / año (Artaza y cols., 1994), que supone unos 15.000 nuevos casos anuales, lo que la aproxima más a los países nórdicos (Appelros y Borgstrom, 1999) que a los anglosajones (Lankisch y cols., 2002). La incidencia en nuestro país es muy variable, encontrando desde zonas de incidencia muy baja, como Cataluña (45-50 casos/10⁶ habitantes / año) (Gatell y

cols., 1979), hasta zonas donde se alcanzan los 370-390 casos/10⁶ habitantes / año (Castilla-León) (Carballo, 1990). En la Comunidad Valenciana la incidencia se situaba a finales de los años ochenta en 160 casos/10⁶ habitantes / año (Carballo y Mateos, 2002).

La etiología de la enfermedad es variada, encontrándonos con dos principales causas etiológicas, las enfermedades de origen biliar y el alcoholismo. Un 10% son debidas a causas no comunes como procedimientos quirúrgicos, infecciones, tóxicos o isquemia, y de un 10% a un 30% no se llega a encontrar la causa denominándolas pancreatitis agudas idiopáticas. En pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la incidencia de la PA es mayor, bien por la propia infección vírica o bien por los efectos secundarios de la medicación antirretroviral, afectando entre el 4 y el 22% de dicha población (Dutta y cols., 1997).

Las diferencias encontradas en la etiología de la enfermedad se deben al género, edad y distribución geográfica. Así, en la mayoría de los países de Europa, España incluida, casi el 60% de los casos de pancreatitis aguda se deben a litiasis biliar, mientras que en Estados Unidos es el alcohol el principal responsable.

La edad más frecuente de aparición de la pancreatitis aguda se sitúa entre los 30 y los 70 años, con un pico a los 55 años. La distribución por sexos tiene ligeras variaciones en función de la etiología. Así, antes de los 50 años es más frecuente en varones y está en relación con la etiología alcohólica, mientras que después de esta edad es la mujer la que sufre más esta enfermedad, en relación con la mayor incidencia de litiasis biliar (Navarro, 1991). Aunque parece que el sexo masculino conlleva peor pronóstico, los resultados son contradictorios (Pezzilli y cols., 1998; Lankisch y cols., 2001).

1.3. Patogenia.

La secreción pancreática se produce de manera basal, en ausencia de comida, y se intensifica en respuesta a la comida, en la denominada secreción postprandial. Está regulada por mecanismos nerviosos, que son importantes para una regulación fina de la secreción, y con más importancia por mecanismos hormonales, destacando entre diversas hormonas que pueden intervenir la secretina y la colecistoquinina.

La secretina que se libera en respuesta a la comida provoca una secreción de un fluido rico en bicarbonato, cloro, sodio y potasio. La importancia del mismo

radica en su alcalinidad, capaz de neutralizar el quimo ácido tamponándolo para que las enzimas pancreáticas actúen correctamente. La colecistoquinina, liberada en respuesta a los productos de la digestión de grasas y proteínas, provoca la secreción de gran cantidad de enzimas digestivas por parte de las células acinares, sin aumentar de forma significativa el volumen de líquido. Estas enzimas (lipasa, amilasa, carboxipeptidasa, elastasa, tripsina y quimotripsina) son los componentes con mayor interés funcional y clínico del jugo pancreático (Navarro y cols., 2002).

La tripsina, la quimotripsina y la carboxipeptidasa son las encargadas de la degradación de proteínas y péptidos. La lipasa pancreática hidroliza los enlaces éster de los triacilglicéridos ingeridos liberando sus componentes ácidos grasos y glicerol. La amilasa actúa sobre el glucógeno, almidón y sus componentes para formar glúcidos fermentables (maltosa) y dextrinas no fermentables. Puesto que tienen tal capacidad destructiva, el páncreas debe protegerse mediante una serie de estrategias para no ser digerido. Una de estas estrategias es segregarse las enzimas en formas no activas que se activarán en la luz intestinal. El tripsinógeno, forma inactiva de la tripsina, se activa por la enteroquinasa de la pared intestinal. La tripsina activa más tripsinógeno y también activa al quimotripsinógeno y la pro-carboxipeptidasa. Otra estrategia es la presencia de inhibidores de las enzimas sintetizadas por el páncreas, como es el inhibidor intrapancreático de la tripsina (α_1 -antitripsina).

Los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso sintetizan las proenzimas que tras pasar a las cisternas del aparato de Golgi se agrupan en los denominados gránulos de zimógeno. Cuando se estimula la secreción pancreática, aumenta la síntesis de proenzimas y los gránulos van migrando hacia la superficie celular, descargando su contenido mediante un proceso de exocitosis en el que los lípidos y las proteínas de la membrana de los gránulos se unen a las del borde apical de la célula.

En 1896, Chiari postuló que la enfermedad descrita sistemáticamente por Fitz siete años antes se debía a la autodigestión del páncreas por sucumbir a sus propias propiedades digestivas (Chiari, 1896). Las ideas de Chiari propiciaron multitud de investigaciones y han servido de base durante muchos años para el estudio de la patogenia de la enfermedad. Pocos años después, Opie formuló la teoría del canal común (Opie, 1901), afirmando que el taponamiento a nivel de la ampolla de Vater formaría un canal común que permitiría el paso de bilis al páncreas causando pancreatitis aguda. Otra posibilidad era el reflujo duodenal, que debido a un mal funcionamiento del esfínter de Oddi, pasase al páncreas digiriéndolo (McCutcheon y Race, 1962). Hoy se sabe que incluso la obstrucción del conducto pancreático por sí sólo puede desencadenar una PA por el aumento de presión intraductal (Austin y cols., 1980).

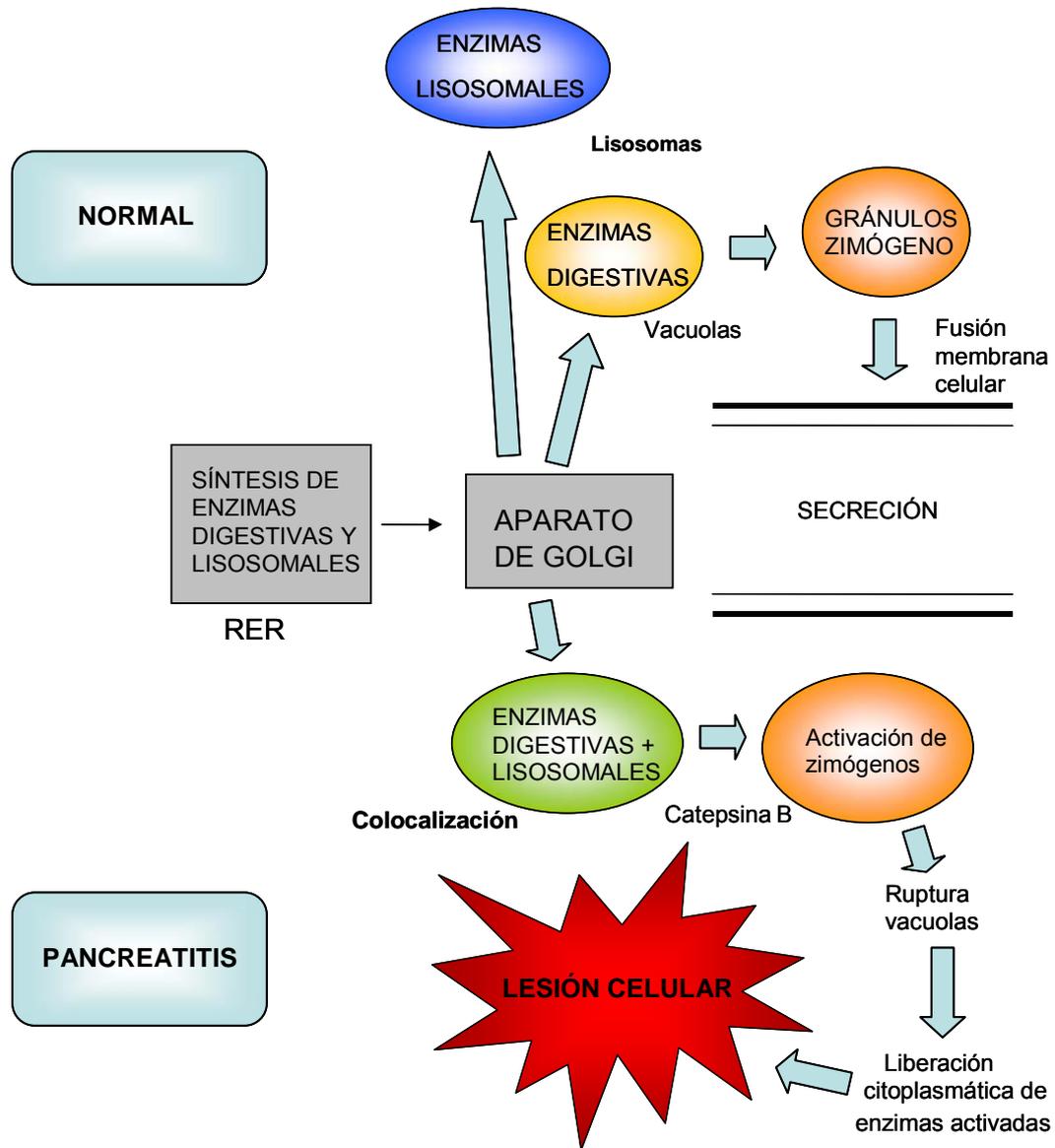
Propiciadas por las teorías de Chiari se realizaron investigaciones para evitar la autodigestión frenando o limitando la secreción de enzimas e inhibiendo enzimas pancreáticas, pero sistemáticamente los resultados inicialmente esperanzadores se transformaban en fracasos al mantenerse los efectos sistémicos de la enfermedad (Büchler y cols., 1993). Los datos experimentales muestran el papel local de la tripsina en la pancreatitis aguda. De hecho, se puede detectar la presencia de tripsina antes del daño celular acinar y también el péptido que se libera tras su activación, denominado péptido de activación del tripsinógeno (Otani y cols., 1998). Además, los pacientes con pancreatitis hereditaria presentan una mutación del tripsinógeno que da lugar a una tripsina resistente a la inactivación (Whitcomb, 1999).

En 1982, Steer y colaboradores observaron que se producía una colocalización de los gránulos de zimógeno cargados de enzimas digestivas con hidrolasas lisosomales en las fases tempranas de la pancreatitis aguda inducida por etionina (Koike y cols., 1982). La colocalización se produce mediante un proceso de crinofagia que supone la fusión de lisosomas con los gránulos de zimógeno (figura 2). Otros modelos experimentales mostraron el mismo proceso, tanto por estimulación con ceruleína como por obstrucción del conducto pancreático, llegándose a observar también fenómenos de endocitosis de enzimas secretadas y alteraciones del transporte de los gránulos de zimógeno (Watanabe y cols., 1984; Saluja y cols., 1989). Se ha demostrado que la catepsina B presente en los lisosomas es capaz de activar al tripsinógeno (Halangk y cols., 2002) y que los ratones *knockout* de la catepsina B presentan menores niveles de tripsina intrapancreática tras la inducción experimental de la PA (Halangk y cols., 2000). Parece que tras la colocalización de los gránulos de zimógeno con los lisosomas, la catepsina B es la causante de la activación del tripsinógeno. Las vacuolas formadas por el mecanismo de colocalización tienen una membrana frágil pudiéndose liberar enzimas destructivas al citoplasma.

Sin embargo, diversas evidencias han cuestionado esta teoría, como la posibilidad de conseguir colocalización sin producir pancreatitis aguda (Luthen y cols., 1995b). Por otro lado, ni la administración de inhibidores de enzimas lisosomales *in vivo* previene el desarrollo de la PA, ni su administración *in vitro* reduce los niveles de activación del tripsinógeno (Steer, 2002).

Aunque limitando la activación de tripsinógeno se disminuye el grado de necrosis acinar en los ratones *knockout* de catepsina B, no se consigue disminuir la respuesta inflamatoria sistémica (Halangk y cols., 2000) y otros mecanismos podrían activar la tripsina, como alteraciones del pH o la NADPH oxidasa de los neutrófilos (Gukovskaya y cols., 2002b).

Figura 2.- Teoría de la colocalización enzimática como fenómeno iniciador de la pancreatitis aguda.



1.4. Fisiopatología. Efectos sistémicos de la pancreatitis aguda.

La pancreatitis aguda presenta una mortalidad relativamente elevada por los efectos sistémicos que produce. Clásicamente se pensaba que el shock era la causa más importante de mortalidad inmediata (Fry, 1988), pero actualmente se considera que es el fallo respiratorio agudo, como se detalla en el apartado 1.4.2.

El shock está producido por una hipovolemia y depresión miocárdica. En las pancreatitis necróticas se aumenta el gasto cardiaco, disminuyéndose las resistencias periféricas y aumentando las resistencias pulmonares con respecto a las pancreatitis leves (Beger y cols., 1986). El íleo paralítico, los vómitos y sobre todo la formación de ascitis y extravasación de fluidos hacia el espacio extracelular, como sucede en el pulmón, produce una pérdida de volumen de aproximadamente un 30% (Wilson y Imrie, 1991). No existe afectación estructural del corazón, así que se ha asociado la posible depresión cardiaca a una disminución de la precarga o por agentes cardiacos extrínsecos (Altimari y cols., 1986) así como descenso del flujo con aumento en la permeabilidad vascular a nivel microcirculatorio, produciendo fenómenos isquémicos tanto en el páncreas como en otros órganos a distancia (Foitzik y cols., 2000). Se pueden detectar además signos de coagulación intravascular diseminada, como la elevación de los niveles de los productos de degradación del fibrinógeno, el descenso en el número de plaquetas y de fibrinógeno y aumento del tiempo de protrombina (Ohlsson y Genell, 1991).

La insuficiencia renal es una complicación frecuente, provocada por la hipovolemia y la hipoperfusión, que conduce a una necrosis tubular aguda. Menos de un 5% de los pacientes con pancreatitis aguda sufren esta complicación, pero aparece en un 20% de los que requieren cuidados intensivos. La mitad de pacientes con fallo renal agudo en la pancreatitis mueren, sufriendo mayor afectación sistémica (Ljutic y cols., 1996).

La afectación hepática directa es baja, con estudios contradictorios al respecto. Parece que la importancia del hígado radica en su contribución a los efectos sistémicos, como por ejemplo, el aumento que produce de fosfolipasa A₂ y su contribución a la afectación pulmonar (Closa y cols., 1996; Closa y cols., 1999).

El aparato digestivo puede afectarse también y su sintomatología queda enmascarada por el cuadro general dificultando su detección. Se puede producir traslocación bacteriana causando complicaciones sépticas y se han descrito

hematomas intramurales difusos, estenosis isquémicas ileales o necrosis del duodeno (Umeno y cols., 2000).

En la mitad de casos de pancreatitis aguda se produce hipocalcemia e hiperglucemia. Las zonas de necrosis secuestran el calcio por un proceso de saponificación, pero la hipocalcemia causada tiene poca repercusión clínica. La hiperglucemia probablemente sea secundaria a la destrucción de los islotes pancreáticos, a la alteración de la secreción de la insulina y del glucagón, y a la liberación de catecolaminas (Windsor y Hammodat, 2000).

Otras afectaciones menos frecuentes son la retinopatía de Purtscher (manchas blanquecinas y zonas de hemorragia alrededor de la mácula) (Hollo y cols., 1994), brotes de artritis (Hammond y Tesar, 1980), nódulos en el tejido celular subcutáneo o lesiones osteolíticas de la médula ósea por necrosis de la grasa secundaria a la liberación de la lipasa (Wilson y Imrie, 1991) e incluso encefalopatía pancreática por el paso de enzimas pancreáticas al líquido cefalorraquídeo (Boon y cols., 1991).

La enfermedad pancreática ha tenido diferentes enfoques a lo largo del tiempo. Al principio se pensaba que la mayoría de los efectos sistémicos de la enfermedad eran fruto de la liberación de enzimas por el páncreas. De hecho, la fosfolipasa A₂ es capaz de alterar el surfactante pulmonar, mientras que la calicreína y la activación del complemento podrían provocar inestabilidad hemodinámica (Lasson y Ohlsson, 1984; Balldin, 1987). Ante esta perspectiva, la estrategia fue usar inhibidores de proteasas para intentar paliar los efectos de dichas proteasas activadas. Aunque se ha relacionado la cantidad de tripsinógeno y tripsina en sangre con la lesión pulmonar asociada a la pancreatitis (Hartwig y cols., 1999) los tratamientos destinados a inhibir el tripsinógeno y la tripsina no han sido del todo satisfactorios.

Diferentes estudios se centraron en la fosfolipasa A₂ por su posible relación con la afectación pulmonar. La PLA₂ es una enzima con una forma asociada a la membrana y otra secretoria (a su vez subdividida en dos tipos). Tiene un papel determinante en diferentes procesos inflamatorios por su acción directa sobre membranas celulares, como mediador de la síntesis de otros mediadores de la inflamación y por su acción como segundo mensajero celular (Vernon y Bell, 1992). La activación de esta enzima refleja el desencadenamiento de procesos hidrolíticos por parte de las proteasas que contienen las células pancreáticas, especialmente la tripsina.

Experimentalmente se ha demostrado que la PLA₂ inhibe la síntesis de fosfolípidos pulmonares y que degrada las lecitinas, lo que conllevaría un descenso en los niveles de surfactante. Además, su instilación a nivel pulmonar produce una serie de cambios caracterizados por edema alveolar, acúmulo de

células inflamatorias, alteración del intercambio gaseoso y alta mortalidad (Edelson y cols., 1991). Clínicamente se ha relacionado la concentración de la PLA₂ con la severidad de la PA (Hietaranta y cols., 1999). De forma experimental, el aumento en los niveles de amilasa plasmática es detectable a la hora de la inducción de la PA pero los niveles de PLA₂ no suben hasta las 6 h tras la inducción, lo que sugiere que la PLA₂ no se libera por destrucción de las células acinares pancreáticas sino que es sintetizada posiblemente por mediadores celulares de la inflamación, macrófagos o neutrófilos (Closa y cols., 1996). A la PLA₂ se le atribuyen numerosos efectos en la afectación pulmonar de la PA, la activación de los neutrófilos y el incremento en la producción del péptido activador de plaquetas (PAF) y del óxido nítrico en los pulmones (Tsukahara y cols., 1999).

1.4.1. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).

El fracaso de los tratamientos destinados a inhibir la fosfolipasa A₂ y las pocas diferencias que existen entre el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica que aparece en la PA y el que surge en otras enfermedades, como puede ser el shock séptico o los grandes quemados, han provocado que se deba cambiar la visión y no nos limitemos sólo a enzimas activadas. Rinderknecht a finales de los años ochenta (Rinderknecht, 1988), propone que son los mediadores de la inflamación los que provocan la activación de las células inmunológicas en órganos a distancia, y que la sobreestimulación o la respuesta incontrolada de estas células daría lugar a las lesiones tisulares que harían fracasar los diferentes órganos hasta entrar en el fracaso multisistémico. De esta forma, serían los mediadores de la inflamación el nexo de unión entre la lesión pancreática, proceso aparentemente local, y la lesión de órganos a distancia que hacen de este proceso una enfermedad sistémica (figura 3).

Tabla 1.- Enumeración de los criterios clínicos del SRIS.

CRITERIOS CLÍNICOS DEL SRIS (se deben cumplir dos o más)	
Temperatura	> 38° C o < 36° C.
Frecuencia cardiaca	> 90 latidos / minuto.
Frecuencia respiratoria	> 20 respiraciones / minuto.
Recuento de leucocitos	> 12x10 ⁹ /L, < 4x10 ¹² /L ó > 10% de inmaduros

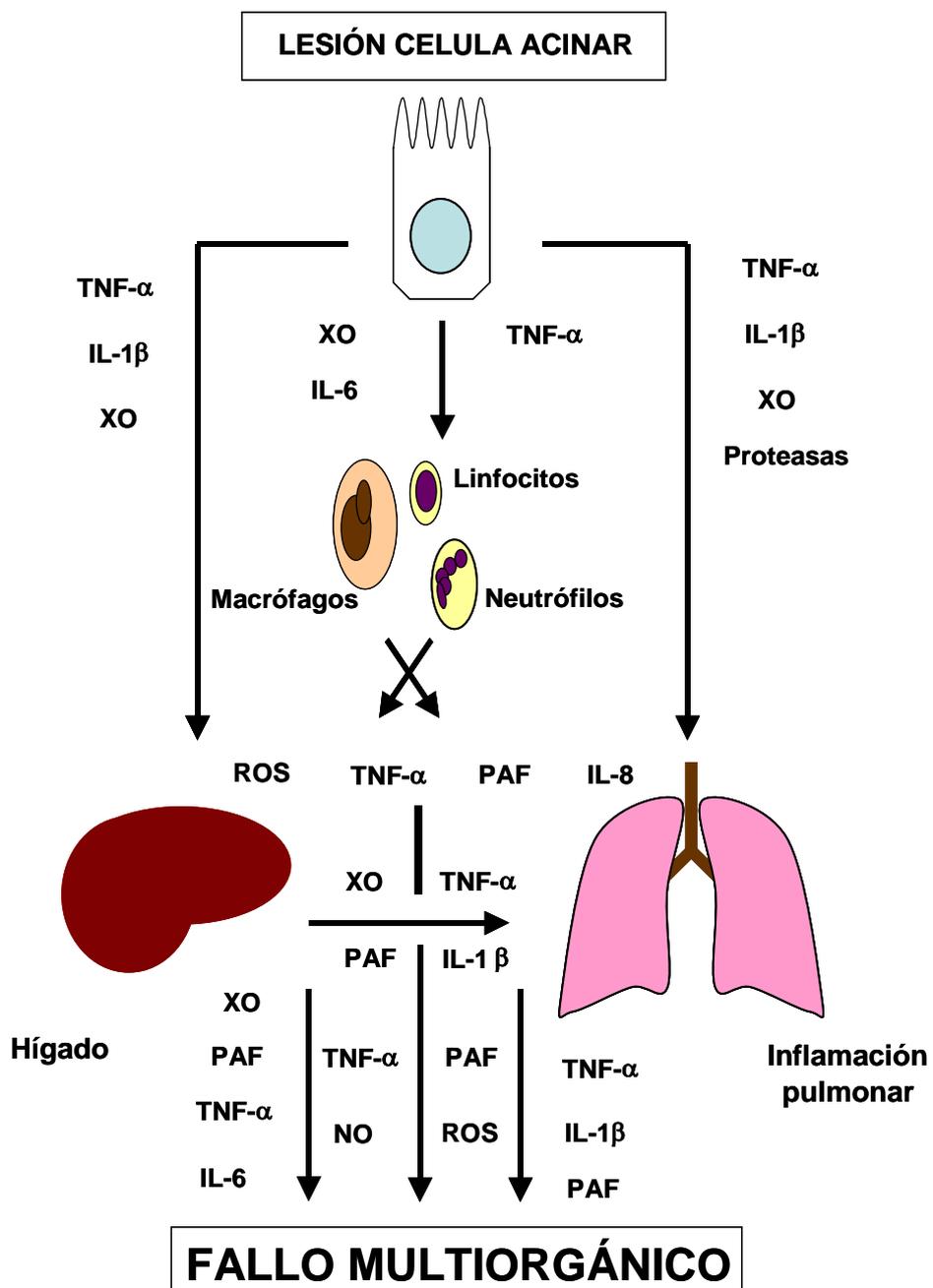
Actualmente, la tendencia es a considerar la pancreatitis aguda grave como bifásica. La primera fase se corresponde con un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) que conduce al fallo multiorgánico responsable de la mortalidad inicial, que puede alcanzar el 60% de los pacientes fallecidos por PA, especialmente cuando existe afectación pulmonar. Si fallan los mecanismos de defensa natural o falla la intervención terapéutica, se desarrollará una segunda fase caracterizada por la aparición de complicaciones locales, generalmente de tipo séptico, que van a crear un segundo pico de mortalidad (Neoptolemos y cols., 1998).

Se considera que el SRIS surge por el descontrol de la respuesta inflamatoria necesaria del organismo ante determinadas agresiones que, en condiciones normales, quedaría confinada al órgano de origen por la acción de inhibidores, agentes antiinflamatorios o mecanismos de contrarregulación. Participan en el SRIS los denominados mediadores de la inflamación los cuales pueden ser clasificados en: componentes celulares, (sobre todo macrófagos y neutrófilos), mediadores de origen celular y mediadores de origen humoral (figura 4). La pancreatitis aguda es por tanto un modelo ideal para estudiar estos procesos de inflamación sistémica (Wilson y cols., 1998).

El fracaso multiorgánico hace referencia a la evolución del SRIS, y se define como el síndrome progresivo, potencialmente reversible, de fallo orgánico que afecta a dos o más sistemas diferentes del órgano de origen. Los síntomas pueden variar entre una disfunción leve transitoria y el fallo irreversible de un órgano, siendo la mortalidad directamente proporcional a la rapidez de instauración y al número de órganos afectados (Giroir, 1999; Buter y cols., 2002).

El grupo de Norman (Norman y cols., 1995a), mediante técnicas de inmunohistoquímica y determinación de mRNA, ha puesto de manifiesto que tras la inducción de la pancreatitis aguda los macrófagos son los iniciadores de la respuesta inflamatoria y, por su capacidad de activar otros leucocitos y producir grandes cantidades de mediadores proinflamatorios, extienden y amplifican la inflamación. Estudios *in vitro* de monocitos obtenidos de pacientes con pancreatitis aguda revelan que estas células se encuentran activadas, observándose un aumento en la secreción de TNF- α e IL-6 en el medio de cultivo celular (McKay y cols., 1996). Los macrófagos alveolares activados tras la inducción de la PA liberan mediadores quimiotácticos capaces de atraer a los neutrófilos al pulmón (Tsukahara y cols., 1996). Las células de Kupffer del hígado también están implicadas en el daño pulmonar resultante de la activación de los neutrófilos (Closa y cols., 1999; Folch y cols., 2000a).

Figura 3.- Papel de los diferentes mediadores de la inflamación en la fisiopatología de la PA.

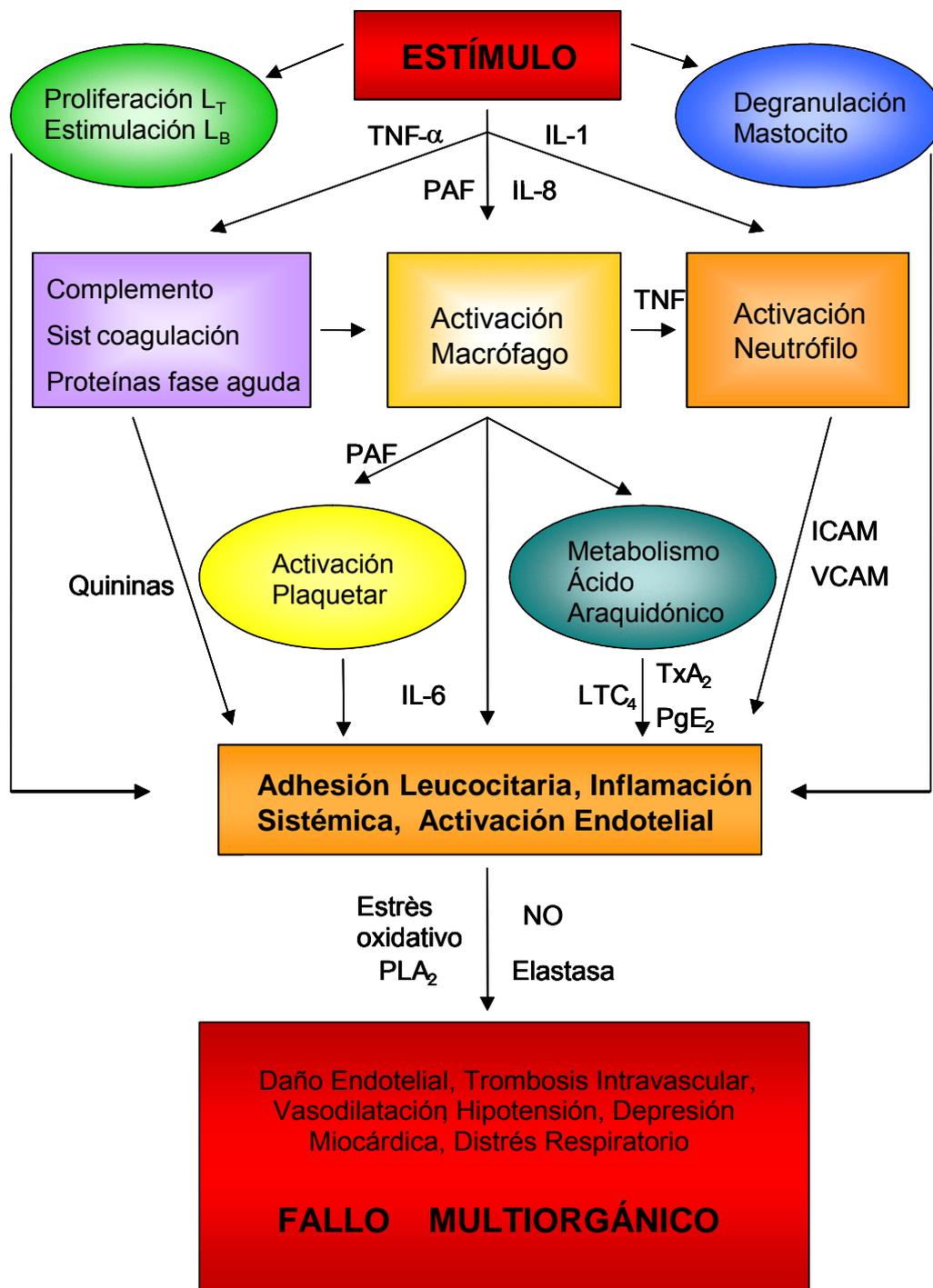


La implicación de los neutrófilos en la fisiopatología de la PA ha quedado demostrada tanto por estudios morfológicos como por la presencia de productos derivados de los neutrófilos en el páncreas, en el pulmón y en el plasma de estos pacientes. Un ejemplo es la mieloperoxidasa, enzima que contienen los neutrófilos, que se utiliza como marcador de infiltración inflamatoria tisular por neutrófilos (Folch y Closa, 2001). La tripsina puede hidrolizar proteínas del complemento produciendo los agentes quimiotácticos C3a y C5a, que podrían reclutar neutrófilos en el páncreas (Acioli y cols., 1997). La elastasa también está implicada en el reclutamiento de neutrófilos (Tsuji y cols., 1994). En modelos de pancreatitis edematosa estos productos parecen ser la principal fuente de radicales libres (Closa y cols., 1994).

La adhesión de los neutrófilos al endotelio y la migración a los tejidos inflamados está controlada en parte por quimioquinas. Se produce en cuatro pasos definidos; rodamiento, activación, fuerte adhesión mediada por integrinas y por último, migración mediante diapédesis.

Otras células implicadas en estos procesos, como son las células endoteliales, tienen un papel primordial en el reclutamiento neutrofilico y la consecuente inflamación. Las células endoteliales expresan una serie de moléculas reguladoras de la marginación y adherencia de los neutrófilos como la P-selectina, la E-selectina, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) (Frossard y cols., 1999). La expresión de dichas moléculas se induce por la presencia bien de citoquinas como el TNF- α , o bien por la presencia de especies reactivas del oxígeno (Folch y cols., 1999). Numerosas evidencias experimentales indican reclutamiento de neutrófilos por el pulmón y una elevada permeabilidad vascular pulmonar (Bhatia y cols., 1998). En modelos experimentales de PA se ha observado que la interferencia en cualquiera de las cuatro fases señaladas anteriormente, en especial las dos primeras, atenúa la gravedad de la afectación pulmonar (Lundberg y cols., 2000). Los mastocitos podrían incluso formar parte del componente celular implicado ya que, situados en vecindad de los vasos de la mayoría de los tejidos, liberan citoquinas, serotonina e histamina que participan en los cambios de la microcirculación típicos de la respuesta inflamatoria asociada a la PA (Dib y cols., 2002).

Figura 4.- Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).



Dentro de los componentes de origen celular, cabe destacar las citoquinas y los radicales libres que se desarrollarán en los siguientes apartados. Asimismo hay que mencionar el factor activador de plaquetas (PAF) y los eicosanoides. La regulación de la producción de PAF está íntimamente relacionada con IL-1 y

TNF- α , puesto que la inhibición de la producción de cualquiera de ambas citoquinas atenúa la producción de PAF, mientras que la inhibición de PAF atenúa la producción de IL-1 y TNF- α (Norman, 1998). De forma experimental, se ha mostrado que produce una liberación masiva de amilasa por parte de las células acinares, promoviendo el infiltrado inflamatorio del páncreas. El páncreas es capaz de producir PAF y las concentraciones pancreáticas aumentan en la pancreatitis aguda (Zhou y cols., 1993). También aumenta en pulmón y en sangre en el desarrollo de la enfermedad (Zhou y cols., 1993). La administración intraperitoneal o intravascular de PAF en modelos experimentales puede provocar o incrementar la severidad de la pancreatitis aguda. Por este motivo se han llevado a cabo estudios clínicos y experimentales con inhibidores del PAF (como el lexipafán), que demuestran una disminución de la respuesta inflamatoria sistémica (Johnson y cols., 2001).

Por su parte, el papel de los eicosanoides en la pancreatitis aguda podría ser algo contradictorio, puesto que en los diferentes modelos experimentales se observan variaciones en los niveles plasmáticos y en los niveles tisulares de cada metabolito. No obstante, algunos leucotrienos son potentes estímulos quimiotácticos para los neutrófilos y la inhibición de la ciclooxigenasa disminuye la severidad de algunos modelos de PA (Ethridge y cols., 2002). Parece que es más importante el papel citoprotector de las prostaglandinas. Estas moléculas son capaces de estabilizar las membranas, evitan la formación de enzimas capaces de generar radicales libres derivados del oxígeno y mejoran el flujo sanguíneo pancreático (Hirano y cols., 1992; Closa y cols., 1993).

Es importante destacar la fracción C5a del sistema del complemento. Esta fracción es un potente mediador proinflamatorio que estimula la contracción del músculo liso e incrementa el flujo vascular y la permeabilidad capilar y atrae los neutrófilos a los pulmones. Sin embargo, se han obtenido algunos resultados paradójicos ya que su inhibición parece agravar la severidad de la PA y la lesión pulmonar asociada (posiblemente porque C5a estimula también la liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-10), lo que podría sugerir un papel contrarregulador del sistema del complemento o de alguna de sus fracciones en el SRIS producido por la PA (Saluja y Steer, 1999).

Por último, estos mediadores, y en especial las citoquinas, pueden inducir aumento de los mecanismos procoagulantes y trombogénicos, con inhibición de los anticoagulantes y fibrinolíticos, que conducen a una coagulación intravascular diseminada.

1.4.2. Afectación pulmonar en la pancreatitis aguda.

A partir de los años 60, las mejoras en el tratamiento de la enfermedad permitieron observar una alta incidencia de afectación pulmonar en detrimento de la mortalidad por efecto del shock hipovolémico y la insuficiencia renal. De hecho, el pulmón es el órgano más afectado en el transcurso de la PA y el 60% de la mortalidad durante la primera semana de la enfermedad está asociada a la insuficiencia respiratoria (Ranson y cols., 1973). Se pueden distinguir tres situaciones clínicas o patrones evolutivos de afectación pulmonar secundaria a la PA: hipoxemia arterial, insuficiencia respiratoria con cambios morfológicos y síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA).

Entre el 50-70% de los pacientes con PA presenta un cierto grado de disfunción respiratoria o defecto de oxigenación leve, con poca repercusión. De estos pacientes, un tercio desarrolla una insuficiencia respiratoria similar al SDRA, propio de grandes quemados, politraumatizados o pacientes sépticos, aumentándose la permeabilidad capilar alveolar y el *shunt* arteriovenoso así como una disminución de la *compliance* pulmonar (Kollef y Schuster, 1995). La muerte puede ocurrir por edema pulmonar debido a la rotura de la membrana alveolocapilar, y es independiente del edema agudo de pulmón de origen cardiogénico. Cabe destacar que el 75% de los pacientes que precisan ventilación mecánica durante el transcurso de la PA fallecen (Warshaw y cols., 1975).

Análíticamente se puede apreciar un aumento en la diferencia de pO_2 alveolar-arterial, es decir, una importante alteración en el intercambio gaseoso (Salomone y cols., 2002).

Morfológicamente se pueden diferenciar tres grados de afectación pulmonar en fallecidos por insuficiencia respiratoria secundaria a la pancreatitis aguda. El primer grado, que corresponde entre el primer y séptimo día de inicio de la pancreatitis, se caracteriza por edema intersticial e intraalveolar, dilatación de los vasos linfáticos, vasodilatación capilar y adhesión de leucocitos (Robertson y cols., 1988). Además, se observa a partir del tercer día la presencia de microtrombos hialinos en los capilares y hemorragias intraalveolares. En el segundo grado, entre el día octavo y decimocuarto, es típica la formación de membranas hialinas y la proliferación de neumocitos. En el último grado, a partir del decimoquinto día, las membranas hialinas se han organizado en tejido fibroso, apareciendo fibrosis intersticial y el epitelio alveolar descamado sufre un proceso de degeneración grasa (Robertson y cols., 1988).

En los modelos experimentales, que caracterizaron la histopatología de la lesión pulmonar asociada a la PA, se observó que tras la inducción de la PA se

producía una importante proliferación y marginación de leucocitos polimorfonucleares en el interior de los capilares pulmonares (Steer, 2001). Posteriormente se observaban marcadas alteraciones de las células endoteliales, edema intersticial y engrosamiento de la membrana alveolocapilar con el consiguiente aumento del peso seco. Finalmente, se producía la destrucción hemorrágica de los alveolos y la pérdida completa de la arquitectura alveolar. Estos cambios morfológicos, que suponen el aumento de la permeabilidad vascular, se traducían funcionalmente como la interferencia en el intercambio gaseoso y producían la alteración de la relación ventilación-perfusión, dando lugar a hipoxemia (Feddersen y cols., 1991; Willemer y cols., 1991).

2. CITOQUINAS.

2.1. Concepto.

Las citoquinas son polipéptidos o glicoproteínas de peso molecular inferior a 30 kDa constituidas por cuatro cadenas con un alto grado de estructura α -helicoidal y en menor medida de tipo β , liberadas principalmente por las células del sistema inmunológico y que actúan como mediadores intercelulares, regulando la respuesta inflamatoria. Denominadas inicialmente interleuquinas, actualmente se denominan genéricamente citoquinas (Abbas y cols., 1994). Constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que comparten propiedades y funciones características, se producen en cantidades muy pequeñas durante las fases efectoras de la inmunidad natural y específica (lo que las hace difícilmente detectables) y sirven para regular las respuestas inmunitaria e inflamatoria. En ocasiones regulan también la división celular y/o tienen capacidad quimiotáctica.

Su secreción es breve, autolimitada y no se almacenan como moléculas preformadas, iniciándose su síntesis por activación de la expresión de los genes que las codifican. Algunas citoquinas pueden controlarse por mecanismos post-translacionales como la liberación proteolítica de un producto activo (Lin y cols., 2000). Las citoquinas tienen función autocrina, paracrina y endocrina, requiriendo síntesis de RNA para la mayoría de las respuestas que provocan (Yamauchi y cols., 2001).

A raíz de los estudios sobre la función de las citoquinas en el síndrome de distrés respiratorio agudo, se comenzó a investigar su papel en la fisiopatología de la PA como mediadores de los efectos tanto locales como sistémicos, en especial tras la ausencia de resultados satisfactorios con los tratamientos basados en la teoría de la autodigestión del páncreas. Así se demostró que la inyección de IL-1 o TNF- α en humanos o animales conducía a la coagulopatía y caída de la presión arterial similar a la encontrada en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; los niveles de las citoquinas proinflamatorias estaban elevados en diferentes modelos de PA y en pacientes con PA grave; y el bloqueo específico de estas citoquinas en modelos experimentales de PA producía una menor afectación sistémica y una mejoría en la supervivencia (Osman y Jensen, 1999).

Los niveles de las citoquinas se han intentado utilizar como marcadores específicos de gravedad de la enfermedad. Todas ellas pueden tener importancia en este aspecto, pero los resultados más satisfactorios se han obtenido con la IL-

6 por su estabilidad y fiabilidad de medida. Tanto es así que numerosos estudios clínicos correlacionan esta citoquina con la severidad de la enfermedad (Viedma y cols., 1992).

Estas citoquinas serían liberadas principalmente por los macrófagos pancreáticos activados y los neutrófilos que infiltran la glándula tras el inicio de la PA, como respuesta a la lesión focal pancreática. En los estudios experimentales desarrollados, destaca el papel de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , pero también IL-6 e IL-8 y las citoquinas antiinflamatorias IL-4 y IL-10.

2.1.1. Citoquinas proinflamatorias y pancreatitis aguda.

Factor de necrosis tumoral α

Principal citoquina proinflamatoria implicada en la respuesta inflamatoria sistémica estudiada, que se definirá con más detalle en el apartado 2.2.

Interleuquina 1

La interleuquina IL-1 es una potente citoquina proinflamatoria. Como el TNF- α , se sintetiza fundamentalmente en los macrófagos activados aunque también en células epiteliales y endoteliales (Fink y Norman, 1997). Existen dos formas de IL-1, IL-1 α e IL-1 β , ambas de 17 kDa que tienen una homología inferior al 30%. Los dos tipos se unen al mismo receptor y tienen efectos biológicos similares aunque la forma α está más ligada a las membranas celulares y la forma β es más fácilmente detectable en sangre (Yamauchi y cols., 2001).

Los efectos biológicos dependen de la cantidad de citoquina liberada actuando de forma sinérgica con el TNF- α . Es capaz de inducir su propia síntesis, así como la síntesis de muchas otras citoquinas como son las IL-2, IL-6 e IL-8 por parte de los macrófagos y del endotelio vascular, donde además, promueve la expresión de moléculas de adhesión y activa la cascada de la coagulación. Indirectamente, por medio de la estimulación de estas células, es capaz de activar a los neutrófilos y conseguir una potente respuesta inflamatoria. A concentraciones elevadas puede producir fiebre, hipotensión, proteólisis muscular, resorción ósea, aumento de la formación de neutrófilos en la médula ósea e inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda como la PCR (Kuby, 1994).

La IL-1 β se correlaciona bien con la severidad de la pancreatitis aguda independientemente del modelo utilizado (Fink y Norman, 1997). La producción de la misma se acompaña de la inducción de sus receptores así como de la enzima convertidora de IL-1, que es responsable de la hidrólisis de la forma pro-

IL-1 β en la forma activa (Fink y Norman, 1997). A nivel pancreático, se ha podido determinar que la fuente inicial de IL-1 β en el curso de la PA experimental son los macrófagos, siendo estos productores más activos incluso que los neutrófilos que infiltran la glándula tras la inducción de la pancreatitis (Fink y Norman, 1996). También se producen en el parénquima pancreático grandes cantidades de receptor antagonista interleuquin-1 (IL-1ra) con papel protector incluso para órganos distales (Norman y cols., 1995b). Los efectos del TNF- α son muy parecidos, de manera que es muy difícil distinguir entre los dos mediadores. Si perfundimos ambos a la vez en un animal, los efectos son sinérgicos (Okusawa y cols., 1988). El tratamiento de los acinos pancreáticos con IL-1 o con TNF- α no causa colocalización de los gránulos de zimógeno ni la liberación de enzimas típica de la pancreatitis, por tanto, no parecen tener un papel iniciador de la enfermedad pero sí relacionado con la posterior cascada inflamatoria (Fink y Norman, 1997). De hecho, en ausencia de IL-1 no se consigue el máximo grado de inflamación, necrosis y edema asociado a la PA e incluso se consigue disminuir la severidad al atenuar ligeramente la mortalidad de la misma (Denham y Norman, 1999)

Interleuquina 6 y 8

La IL-6 se produce por numerosas células como son los macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células musculares lisas. Es la principal citoquina mediadora de la síntesis de las proteínas de fase aguda como la PCR, el fibrinógeno y la haptoglobina y su administración induce piroxia. IL-6 se sintetiza en respuesta al estímulo de TNF- α , IL-1 y endotoxina. IL-6 es el inductor primario de la respuesta proteínica de fase aguda (Biffi y cols., 1996). Su importancia radica en que su detección en suero es rápida y fiable, siendo detectable desde los 60 min después de iniciarse su producción hasta 10 días más tarde (con un máximo a las 4-6 h). Aprovechando esta propiedad, varios trabajos clínicos han conseguido correlacionar los niveles de IL-6 en suero con la severidad de la PA (Viedma y cols., 1992). Además, en modelos de PA experimental existe tanto un aumento en los niveles de IL-6 sérico como en la expresión de su mRNA en diferentes tejidos como hígado y pulmón (Kusske y cols., 1996).

La IL-8 pertenece a una familia de citoquinas pequeñas de 8 a 10 kDa, denominadas quimioquinas, que se encargan de activar y dirigir a los leucocitos a las zonas de daño. Es una citoquina activadora de linfocitos T y de neutrófilos, además de un potente agente quimiotáctico para dichas células. Se sintetiza en varios tipos celulares en respuesta al TNF- α , destacando los macrófagos y las células endoteliales. Se considera como el principal mediador secundario de la activación de neutrófilos por el TNF- α ya que provoca la migración, expresión de

moléculas de adhesión, degranulación y generación de radicales libres derivados del oxígeno por estos leucocitos (Gross y cols., 1992). Sin embargo, administrada a los animales no provoca un estado de shock como el TNF- α o la IL-1 β .

Experimentalmente se ha observado un incremento de la concentración de IL-8 en el transcurso de la pancreatitis aguda en páncreas, suero y pulmón. Los niveles elevados se correlacionan con la elevación de la elastasa neutrofílica, un marcador de la activación neutrofílica que puede causar daño si se encuentra en alta concentración (Gross y cols., 1992). En pacientes humanos se ha correlacionado tanto la severidad como el pronóstico de la enfermedad con los niveles séricos de IL-8, a pesar que la interleuquina 6 se presenta como un mejor marcador temprano de severidad que la IL-8 (Chen y cols., 1999).

2.1.2. Citoquinas antiinflamatorias y pancreatitis aguda.

La IL-4 es una citoquina producida por los linfocitos T_{H2}, con acción antiinflamatoria indirecta, ya que modula la proliferación de las células implicadas en la respuesta inflamatoria y la producción de citoquinas inflamatorias por parte de linfocitos T, B, NK y macrófagos. Como ocurre con la IL-10, su papel en la fisiopatología de la PA está poco estudiado, pero parece que existe un descenso en sus niveles durante la PA (Osman y Jensen, 1999).

La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria que modula la expresión de las citoquinas proinflamatorias que se producen al principio de la inflamación e inhibiendo la formación de TNF- α , IL-1, IL-6, e IL-8 (Fiorentino y cols., 1991). Estimula también la producción del antagonista del receptor de IL-1 y la liberación del receptor soluble p75 del TNF- α (Seitz y cols., 1995). La mayoría de los trabajos experimentales que utilizan IL-10 o alguno de sus agonistas (IT9302) como agente terapéutico, disminuyen la severidad y la mortalidad de la PA al disminuir la expresión del gen del TNF- α (Kotenko y cols., 2001).

Además, la interleuquina 10 tiene un papel protector en pacientes humanos con pancreatitis aguda. Los niveles cambian de indetectables a marcadamente elevados dentro de las 24 h de la aparición de la enfermedad, siendo más altos en aquellos pacientes con pancreatitis aguda leve que en los que sufren la forma severa de la enfermedad (Pezzilli y cols., 1997).

2.2. Factor de necrosis tumoral α (TNF- α).

2.2.1. Estructura y función del TNF- α .

El factor de necrosis tumoral es un polipéptido que se describió en primer lugar como una proteína capaz de matar células tumorales *in vitro* (Old, 1988), pero pronto se vio que tenía otras muchas acciones como provocar fiebre, shock, necrosis tumoral, anorexia, embriogénesis, proliferación y diferenciación celular o muerte celular y se ha asociado también a la fisiopatología de muchas enfermedades.

Se produce a partir de un precursor de 26-kD unido a la membrana. La acción catalítica de una desintegrina y metaloproteinasa denominada enzima convertidora de TNF- α (ECTA) libera la forma soluble de 17-kD que es capaz de activar receptores específicos del TNF- α . Existe además una forma β que se une a los mismos receptores y tiene los mismos efectos. El TNF- α de membrana es activo y parece que es el principal ligando de uno de sus receptores (TNFR₂). Una vez liberado de la membrana se agrega formando complejos de tres moléculas que se unen y activan los receptores. El TNF- α es capaz de inducir la síntesis de otros mediadores de la inflamación, como la IL-10, y su propia síntesis (Vassalli, 1992). El gen que codifica el TNF- α consta de 4 exones y 3 intrones y reside en la región de clase III del complejo mayor de histocompatibilidad. En su región promotora posee elementos reguladores y zonas de unión para múltiples factores de transcripción como NF- κ B o AP-1. La regulación postranscripcional del mRNA del TNF- α es muy compleja, e interviene en ella las MAP quinasas.

Las células que mayor cantidad de TNF- α sintetizan son los monocitos y los macrófagos, aunque también lo producen los linfocitos B y T, las células NK, los astrocitos, las células de Kupffer, los queratinocitos, las células de Paneth, los enterocitos, las células musculares lisas, las células acinares y cierto tipo de líneas celulares tumorales. El principal estímulo para su producción es el lipopolisacárido, pero su producción se ve aumentada también en respuesta a bacterias, virus, citoquinas (IL-1, IL-2 o GM-CSF), complejos inmunológicos (complejo mayor de histocompatibilidad), radiación X, cristales de urato, factor C5a del complemento y especies reactivas derivadas del oxígeno (Tartaglia y Goeddel, 1992).

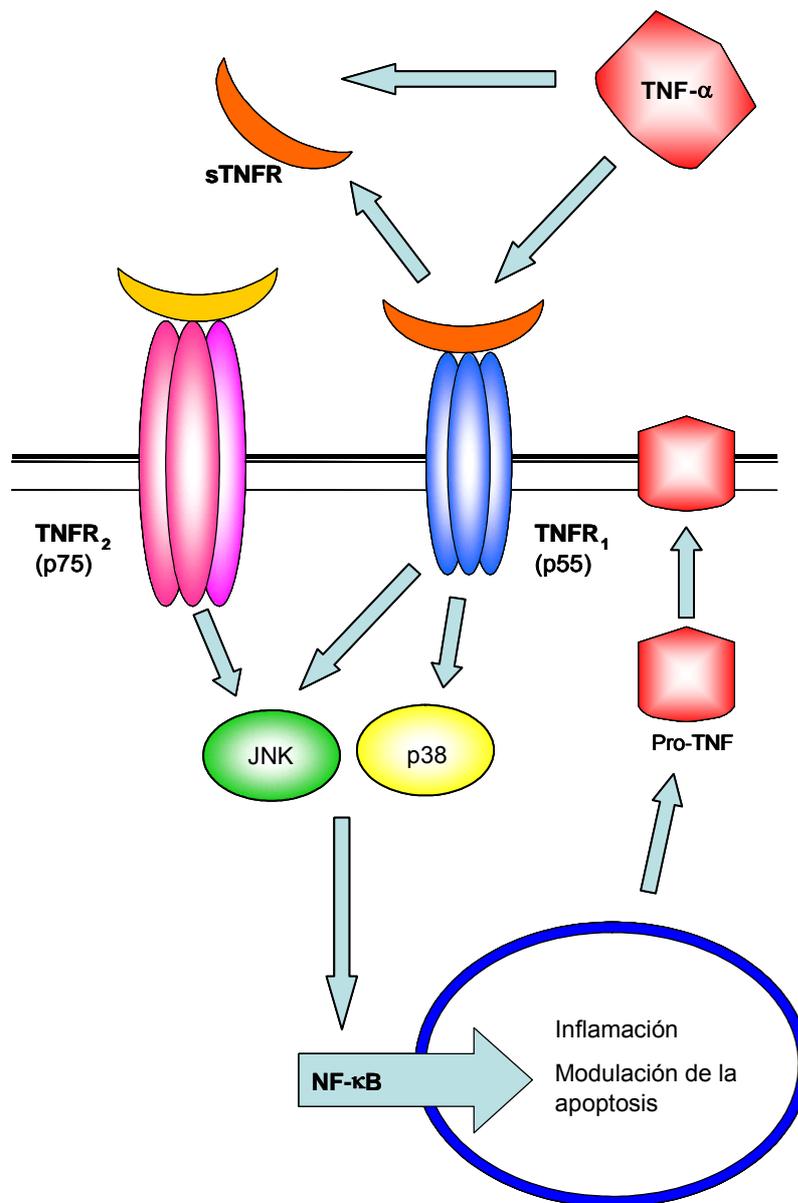
El TNF- α tiene dos receptores, codificados por genes diferentes, que se conocen como p55/TNFR₁ y p75/TNFR₂, de 55 y 75 kDa respectivamente. El TNFR₁ se expresa en numerosos tipos celulares, mientras que el TNFR₂ se encuentra predominantemente en leucocitos y células endoteliales. Forman parte de una familia de receptores con un extremo extracelular rico en cisteína. La

porción intracelular del receptor TNFR₁ contiene el *dominio de muerte* que se requiere para la apoptosis y la activación de NF-κB. El reclutamiento de determinadas proteínas, como proteínas asociadas a Fas o a la caspasa-8, conducen a apoptosis, mientras que el reclutamiento del factor 2 asociado al receptor de TNF y la *receptor-interacting protein* conlleva activación de JNK y de NF-κB (Hallenbeck, 2002). Si comparamos la afinidad del TNF-α con otras citoquinas, la afinidad del TNF-α por los receptores TNFR₁ es extraordinariamente baja. No obstante, puesto que se sintetiza en grandes cantidades, los receptores se saturan con facilidad. Ambos receptores pueden mediante proteólisis liberar la parte extracelular, que mantiene afinidad por el TNF-α constituyendo los receptores solubles de TNF-α (figura 5). La unión a estos receptores solubles (sTNF-αR) por un lado aumenta la biodisponibilidad del TNF-α pero parece inhibir su acción y dificulta su medida (Folch y cols., 2001).

Los efectos del TNF-α son diversos, puesto que los receptores están distribuidos ampliamente por muchos tipos celulares y además estimulan muchos mediadores. La concentración de TNF-α y la rapidez de su síntesis diferencian también los efectos. A bajas concentraciones, unos 10⁻⁹ M, actúa localmente como regulador paracrino y autocrino de los leucocitos y las células endoteliales. La lista de moléculas que modula es enorme, destacando moléculas de adhesión, interleuquinas y factores de coagulación. Estimula aloproteinasas que contribuyen a la hemorragia y al aumento de permeabilidad vascular. Induce también la producción de especies reactivas de oxígeno mediante diferentes fuentes, como son la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa y la NADPH oxidasa (Hallenbeck, 2002).

A mayores concentraciones, entre 10⁻⁹ y 10⁻⁷ M, el TNF-α pasa al torrente circulatorio y desarrolla efectos sistémicos. Tiene efecto pirógeno, igual que la IL-1, por su interacción con las células reguladoras del hipotálamo en las que induce un aumento en la producción de prostaglandinas. Actúa sobre el hígado para aumentar la síntesis de proteínas plasmáticas como la proteína C reactiva, la macroglobulina α₂ y el fibrinógeno, dando lugar a un proceso conocido como respuesta de fase aguda a la inflamación. Por otro lado, activa el sistema de la coagulación y es capaz de inhibir la división de las células madre de la médula ósea, produciendo linfopenia e inmunodeficiencia.

Crónicamente y a concentraciones bajas da lugar a un estado de pérdida de peso y caquexia (por eso se denominó caquectina), disfunción metabólica producida por el catabolismo de las proteínas, depleción de lípidos, resistencia a la insulina, atrofia de las células musculares y de los adipositos (Papadakis y Targan, 2000).

Figura 5.- Receptores de TNF- α y mecanismo de acción intracelular.

Cuando las concentraciones de TNF- α son superiores a 10^{-7} M, se produce una situación similar al shock, en la que los animales de experimentación mueren por colapso circulatorio y coagulación intravascular diseminada. Esta situación es similar a la sepsis por bacterias gram-negativas. Deprime la contractilidad miocárdica mediante el NO que reduce la actividad de la célula miocárdica. Los efectos sobre la tensión arterial se atribuyen a la acción directa del TNF- α sobre las células musculares lisas y a sustancias vasodilatadores que estimula como el NO y las prostaglandinas. Los efectos procoagulantes están producidos por el aumento de factores de la coagulación y la estimulación de los leucocitos. Estos mecanismos explicarían la relación del TNF- α con el síndrome de distrés

respiratorio del adulto, la necrosis gastrointestinal, la necrosis tubular aguda o la hemorragia suprarrenal. También se producen los síntomas de caquexia pero exacerbados.

El TNF- α ha sido diana de numerosos intentos farmacológicos de frenar procesos patológicos. Los agentes que incrementan la concentración de AMPc intracelular, como la pentoxifilina y el rolipram, bloquean la secreción de TNF- α por parte de los macrófagos. La talidomida y sus análogos inhiben la producción de TNF- α y de otras citoquinas mediante la acción de fosfodiesterasas y favoreciendo la degradación del mRNA del TNF- α en los macrófagos. Estimula además la síntesis de citoquinas antiinflamatorias como la IL-2 y la IL-10. La mayoría de los agentes inmunosupresores, como los corticoides, la ciclosporina, la mesalamina o los salicilatos actúan inhibiendo mediadores intracelulares como las MAP quininas o factores de transcripción como el NF- κ B, que modulan la expresión de los genes encargados de la síntesis de TNF- α . Los inhibidores de las metaloproteasas interfieren en la separación del TNF- α de la membrana celular. Las esperanzas se han centrado en los anticuerpos monoclonales antiTNF- α (infliximab, CDP571), muy estudiados en relación con la enfermedad inflamatoria intestinal (Baert y cols., 1999). Entre los agentes endógenos que inhiben la producción de TNF- α encontramos otras citoquinas (IL-10), derivados del ácido araquidónico o catecolaminas.

2.2.2. TNF- α y pancreatitis aguda.

En el estudio de la pancreatitis aguda, se ha observado elevación de los niveles séricos de TNF- α (Grewal y cols., 1994a; Norman y cols., 1995a). Los receptores solubles también se liberan en los estadios tempranos de la enfermedad, coincidiendo con el incremento de TNF- α (Granell y cols., 2004b). El TNF- α serológico se une mayoritariamente a proteínas específicas, probablemente a sus propios receptores solubles, e induce la liberación del receptor sTNF- α R-I (Granell y cols., 2004b). La presencia de dicho receptor puede interferir con la medida de los niveles séricos de TNF- α . El aumento en los niveles de los receptores podría explicarse por la liberación de grandes cantidades de proteasas, que producirían la liberación de la porción soluble del receptor transmembranoso y la formación de complejos TNF- α /sTNFR, aunque estos podrían no ser detectados por métodos que sólo determinen la fracción del TNF- α libre no unida a proteínas. Además, la medida del TNF- α se dificulta aun más por su corta vida media, la variabilidad de los inmunoanálisis y la presencia de inhibidores circulantes de TNF- α . Para minimizar los errores, los niveles de

TNF- α total (el libre más el unido al receptor) deben ser medidos en vez del TNF- α libre para estudiar la evolución de la producción de TNF- α (Folch y cols., 2001). Además, las concentraciones de los receptores solubles plasmáticos del TNF- α se han correlacionado con el desarrollo de fallo multiorgánico, puesto que estaban significativamente elevados en pacientes con esta respuesta severa en comparación con pacientes sin ella (Hirota y cols., 2000).

La liberación del TNF- α se produce desde diferentes tejidos en el curso de la pancreatitis aguda. Aunque las células acinares pueden producir TNF- α , los leucocitos del infiltrado inflamatorio dentro del tejido pancreático son considerados la fuente principal (Norman, 1998). Tras el incremento de la expresión del TNF- α en el páncreas, se induce su mRNA y la proteína pocas horas más tarde en pulmón, hígado y bazo (Norman y cols., 1997). La producción extrapancreática contribuye significativamente a los niveles sistémicos de esta citoquina, puesto que el bloqueo de las células de Kupffer mediante el cloruro de gadolinio reduce los niveles de TNF- α en suero en la pancreatitis hemorrágica en ratas (Gloor y cols., 2000). Cabe destacar que la concentración de TNF- α dentro del tejido pancreático es varias órdenes de magnitud superior que la encontrada en el suero y por tanto podría ser tóxica para las células (Norman, 1998). En consecuencia, el TNF- α puede contribuir a la severidad de la pancreatitis por medio de la inducción de apoptosis o de necrosis en las células acinares (Norman, 1998). De hecho, se ha descrito que el TNF- α activa mecanismos apoptóticos y antiapoptóticos en células AR42J. Estos mecanismos antiapoptóticos están mediados por PAP-1 (Malka y cols., 2000). Nuestro grupo ha observado anteriormente que la inhibición del TNF- α por la pentoxifilina disminuye marcadamente el infiltrado inflamatorio, el edema y la depleción del glutatión en páncreas, así como la actividad lipasa en suero tras la pancreatitis inducida por ceruleína en ratas (Gomez-Cambronero y cols., 2000). En el modelo de PA grave inducida por taurocolato, no se consiguen resultados beneficiosos sobre el páncreas pero sí que se consigue disminuir los niveles de TNF- α e incluso la mortalidad utilizando pentoxifilina (Marton y cols., 1998). De forma similar, en ratones knockout deficientes de receptores de TNF- α la tasa de mortalidad debida a pancreatitis aguda necrótica disminuye, puesto que la respuesta sistémica estaba restringida, a pesar que no hubo reducción en la severidad del daño pancreático (Denham y cols., 1997).

Sin embargo, los efectos de los anticuerpos anti-TNF- α son contradictorios. Utilizando anticuerpos anti-TNF- α se ha observado un aumento del edema tanto a nivel pancreático como pulmonar en el modelo de pancreatitis inducida por ceruleína (Guice y cols., 1991). Sin embargo, en el modelo de pancreatitis inducida por taurocolato, se ha observado una mejoría en los parámetros bioquímicos que determinan la severidad de la PA (Grewal y cols., 1994b). En

resumen, existen evidencias que implican al TNF- α en la fisiopatología de las complicaciones tanto locales como sistémicas características de la PA grave. No obstante, está poco esclarecido aún su papel definitivo tanto en la muerte celular como en la respuesta inflamatoria.

Por último, cabe destacar que a pesar de todas las evidencias que implican a las citoquinas proinflamatorias en la progresión de la pancreatitis aguda, ningún ensayo clínico enfocado en la modulación de estas citoquinas ha mostrado efectos beneficiosos claros (Yamauchi y cols., 2001). Sin embargo, se espera que el descubrimiento de inhibidores específicos de citoquinas proinflamatorias permita el desarrollo de una terapia anti-inflamatoria efectiva (Norton y Clain, 2001).

3. RADICALES LIBRES.

3.1. Concepto de radical libre.

Un radical libre es una molécula, fragmento de molécula o átomo que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo. Tienen una vida media extraordinariamente pequeña del orden de milisegundos debido a su gran reactividad, aunque puede variar según el tipo de radical libre.

Estas moléculas o átomos tremendamente reactivos se encuentran implicados en el inicio y desarrollo de numerosas enfermedades (Gutteridge, 1993). Tras la evidencia del papel patológico de estos compuestos, se han abierto numerosas vías de investigación con el fin de modular o paliar sus efectos deletéreos. En el medio biológico, los radicales libres más frecuentes son compuestos oxigenados y se les llaman especies reactivas de oxígeno (ERO). La vida, al desarrollarse en presencia de oxígeno, ha convivido con estas ERO que se han mostrado responsables del daño oxidativo a macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, glúcidos y proteínas (Halliwell, 1996). Multitud de patologías sin nexo de unión se han visto relacionadas por la presencia de estas ERO, incluso en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Bondy, 1992) o el ejercicio físico (Sastre y cols., 1992). De cualquier forma, en muchas de estas patologías y procesos fisiológicos se desconoce todavía si son causa o consecuencia. En general, cualquier agresión a un tejido puede causar ruptura celular y liberación del contenido intracelular en el área que rodea la zona lesionada. Esto incluye a los metales de transición, capaces de generar pequeñas cantidades de radicales libres que al superar la capacidad de eliminación pueden agravar un proceso patológico (Del Maestro y cols., 1980).

Además de las especies reactivas de oxígeno, existen también radicales libres nitrogenados o especies reactivas de nitrógeno (ERN) cuya importancia aunque en principio menor que la de las especies reactivas de oxígeno, ha crecido considerablemente en la actualidad.

3.2. Clases de Radicales libres.

Existen muchas clases de radicales libres, tanto dentro de las ERO como de las ERN. Entre los más importantes podemos destacar los siguientes: el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), poco reactivo pero potencialmente tóxico por los intermediarios

que puede producir; el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que, sin ser un radical libre, puede atravesar las membranas causando daño oxidativo lejano; el radical hidroxilo (OH^\bullet) que es muy reactivo y con semivida extremadamente corta; el radical peroxilo (ROO^\bullet) que surge de la peroxidación lipídica y el óxido nítrico (NO^\bullet) que tiene muchas funciones fisiológicas, pero que reaccionando con el superóxido puede formar peroxinitrito ($ONOO^-$) que es muy tóxico. La sobreproducción de NO en el desarrollo de la PA produciría alteraciones en la microcirculación pancreática y serviría como potente estímulo para atraer a los neutrófilos tanto al tejido pancreático como al pulmonar.

3.3. Génesis de las especies reactivas de oxígeno.

Los radicales libres de oxígeno pueden producirse tanto de forma endógena como proceder de fuentes exógenas (Freeman y Crapo, 1982; Baeuerle y Henkel, 1994). Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies de formación endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres que no son producidos por él mismo. En la dieta son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante, además son fuente de radicales libres el humo del tabaco, la polución ambiental, el ozono, etc. (Ames, 1983; Pryor y cols., 1995; Rock y cols., 1996). En cambio, algunas especies reactivas de oxígeno surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, otras especies activadas de oxígeno sin embargo se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (Halliwell, 1991). Podemos por tanto distinguir las fuentes exógenas de génesis de especies reactivas de oxígeno de las fuentes endógenas.

3.3.1. Fuentes endógenas

3.3.1.1. La cadena de transporte electrónico mitocondrial.

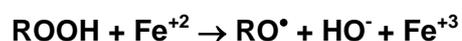
La cadena de transporte electrónico mitocondrial no funciona de manera perfecta y es una de las principales fuentes de radicales libres en la célula. De hecho, se calcula que entre el 2 y el 5% de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno (Cadenas y cols., 1977; Frei, 1994). Para que

la reducción del oxígeno sea completa su reducción requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante. Para ello, el citocromo a_3 del complejo IV de la cadena respiratoria debe mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta la formación de dos moléculas de H_2O (Benzi y Moretti, 1995). Por el contrario, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O_2 , pero no son capaces de retener el ión superóxido formado (Benzi y Moretti, 1995).

La especie radical así formada es el $O_2^{\bullet-}$, producida del orden de 10^{10} moléculas de $O_2^{\bullet-}$ por célula y por día (Ames y cols., 1993) que realiza un daño *in situ*, pero pudiendo también dismutarse formando peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno sí es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris y cols., 1972).

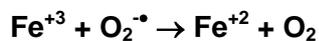
3.3.1.2. Reacción de Fenton-Haber-Weiss.

Se descubrió a finales del siglo pasado que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno, que es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición, y de Fe^{+2} (reactivo de Fenton) (Fenton, 1894). Fueron Haber y Weiss quienes dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 que a su vez se descompone en el radical hidroxilo y el ion hidroxilo (Haber y Weiss, 1932). Se describió la reacción de reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe^{+2}) y, en menor medida, el cuproso (Cu^+) y otros iones, hoy denominada reacción de Fenton-Haber-Weiss que se representa en general:



El hierro parece ser el metal más importante que actúa en los sistemas biológicos a pesar que se puede realizar la reacción con otros metales diferentes. El Fe^{+2} con facilidad se oxida a Fe^{+3} , que es químicamente más estable y muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell y Gutteridge, 1986). El ion férrico puede sin embargo ser reducido por el ascorbato (Rawley y

Halliwell, 1983; Sawyer, 1988) y el radical superóxido (Frei, 1994), con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



No obstante, no se ha podido explicar claramente la reducción del H_2O_2 catalizada por metales en células de mamífero ya que hay un gran número de proteínas de unión a metales (ferritina, transferrina, ceruloplasmina...) que actúan como reserva de iones metálicos e impiden que estos iones participen en reacciones redox (Halliwell y Auroma, 1991; Rouault y Klausner, 1996).

3.3.1.3. La enzima xantina óxidoreductasa como fuente de radicales libres.

La enzima xantina óxidoreductasa (XOR) es una enzima descrita originalmente como una aldehído oxidasa en 1902 (Schardinger, 1902). Actualmente se sabe que existen dos formas de la enzima, la xantina deshidrogenasa y la xantina oxidasa, que se forma por modificaciones post-translacionales a partir de la forma deshidrogenasa. Ambas formas enzimáticas catalizan la hidroxilación de una amplia gama de sustratos como purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos. (Hille y Nishino, 1995; Hille, 1996).

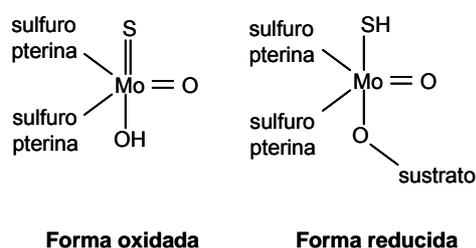
3.3.1.3.1. Estructura enzimática.

La xantina deshidrogenasa y la xantina oxidasa son el producto del mismo gen, tienen un tamaño similar, el mismo nº de subunidades y requieren los mismos cofactores (Hille y Nishino, 1995). Ambas formas están formadas por dos subunidades idénticas y catalíticamente independientes. Cada subunidad la forman 1333-1358 aminoácidos, y esta estructura enzimática se conserva filogenéticamente sin grandes variaciones en los seres vivos. La forma activa tiene un peso molecular de 290 kD en conjunto. Cada homodímero tiene actuación independiente en la catálisis y contiene un cofactor de molibdopterina, dos centros ferrosulfurados espectroscópicamente distintos, y un cofactor FAD.

Las dos formas enzimáticas tienen tres dominios, a destacar el conocido como el dominio de molibdo-pterina. Este es el dominio con el que interacciona la xantina en la reacción de catálisis (Enroth y cols., 2000), donde actúa el alopurinol para inhibir la enzima (Massey y cols., 1970), y donde se une el nitrito para formar óxido nítrico.

El dominio molibdo-pterina se compone de un átomo de molibdeno unido a la cadena de aminoácidos que se une mediante un doble enlace a un átomo de azufre. Posee también un átomo de oxígeno unido con un doble enlace y otro átomo de oxígeno unido con un enlace simple (figura 6) (Hille, 1996). Este oxígeno unido mediante un simple enlace es el que debe ser transferido al sustrato durante la catálisis, para ser repuesto posteriormente del agua (Xia y cols., 1999). En las enzimas en las que el átomo de azufre unido mediante enlace covalente al átomo de molibdeno es sustituido por un átomo de oxígeno, el cofactor molibdo-pterina es inactivo.

Figura 6.- Representación gráfica de los enlaces del átomo de molibdeno.



Por otra parte, y dado que la XO ha sido considerada por algunos autores como una fosfoproteína, es de destacar en cuanto a su estructura que posee dos grupos fosfato en el sitio FAD y uno en el sitio de Molibdopterina (Davis y cols., 1984). Estos grupos fosfato pueden estar implicados en la regulación de la actividad enzimática.

3.3.1.3.2. Conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa.

La xantina óxidoreductasa es sintetizada como xantina deshidrogenasa y se mantiene mayoritariamente como tal en la célula, pero puede convertirse rápidamente en la forma xantina oxidasa mediante oxidación de los residuos sulfidrilos o mediante proteólisis. Esta conversión sólo ocurre en la xantina deshidrogenasa de los mamíferos, incluida la humana y la de rata (Hille y Nishino, 1995), en contraposición a otras especies, como las aves, en las que no se ha descrito conversión a XO.

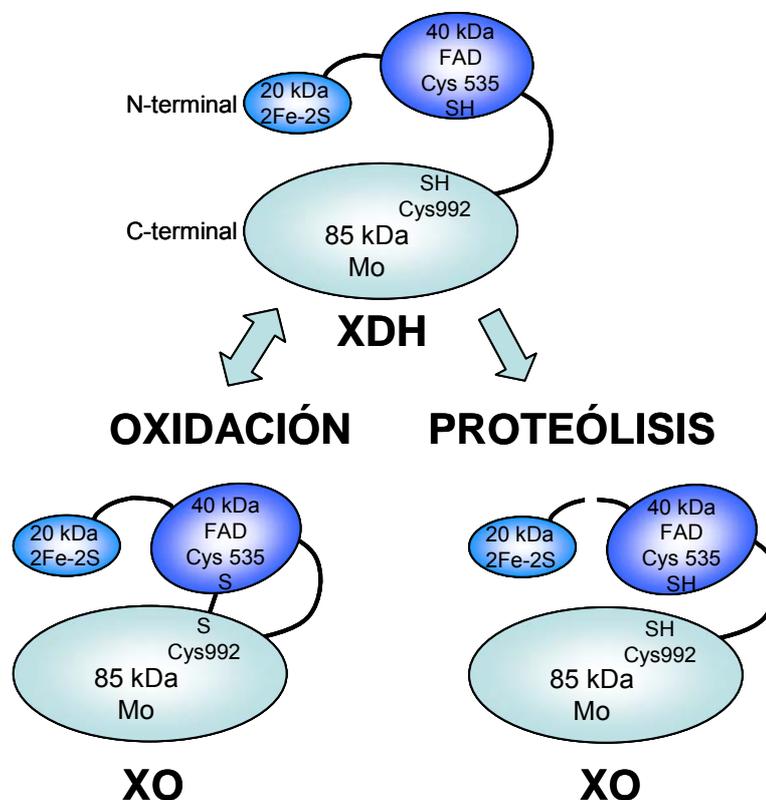
Así como la xantina oxidasa se relaciona con diversos procesos patológicos y produce un daño oxidativo a los tejidos, la xantina deshidrogenasa puede ser un importante componente de la defensa del organismo contra el daño provocado por los radicales libres a través de la acción antioxidante del ácido úrico, que es un potente antioxidante.

La enzima, *in vivo*, está mayoritariamente en la forma deshidrogenasa, y esta enzima puede transformarse en la forma oxidasa en ciertas condiciones (Stirpe y Della Corte, 1969) a través de un proceso reversible o bien a través de un proceso irreversible (figura 7).

La conversión de XDH a XO de forma reversible se lleva a cabo mediante calentamiento o mediante oxidación de los grupos tiol de los residuos de cisteína para formar puentes disulfuro (Stirpe y Della Corte, 1969). Por otro lado, la conversión de la enzima de forma irreversible se produce por proteólisis (Stirpe y Della Corte, 1969), la cual puede ser llevada a cabo con tripsina que corta la enzima tras el residuo de lisina 551, o se lleva a cabo con pancreatina (un extracto de enzimas digestivas pancreáticas) que corta la enzima tras los residuos leucina 219 y lisina 569 (Enroth y cols., 2000). Se ha observado que la quimotripsina corta la cadena proteica de la enzima tras el residuo de fenilalanina 560 sólo cuando se encuentra en la forma oxidada, mientras que en otros puntos de la proteína corta por igual la forma deshidrogenasa que la oxidasa. Se ha sugerido que la forma reversible precede a la irreversible, y la conversión reversible viene precedida por la depleción de GSH (McKelvey y cols., 1988).

Las transformaciones producidas causan un considerable cambio conformacional, de forma que se modifica el ambiente electrostático del centro activo y se bloquea parcialmente el acceso del sustrato NAD al cofactor flavín adenina dinucleótido. Este cambio conformacional es responsable de las diferentes afinidades que ambas formas enzimáticas tienen por los sustratos (Enroth y cols., 2000).

Figura 7.- Conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa.

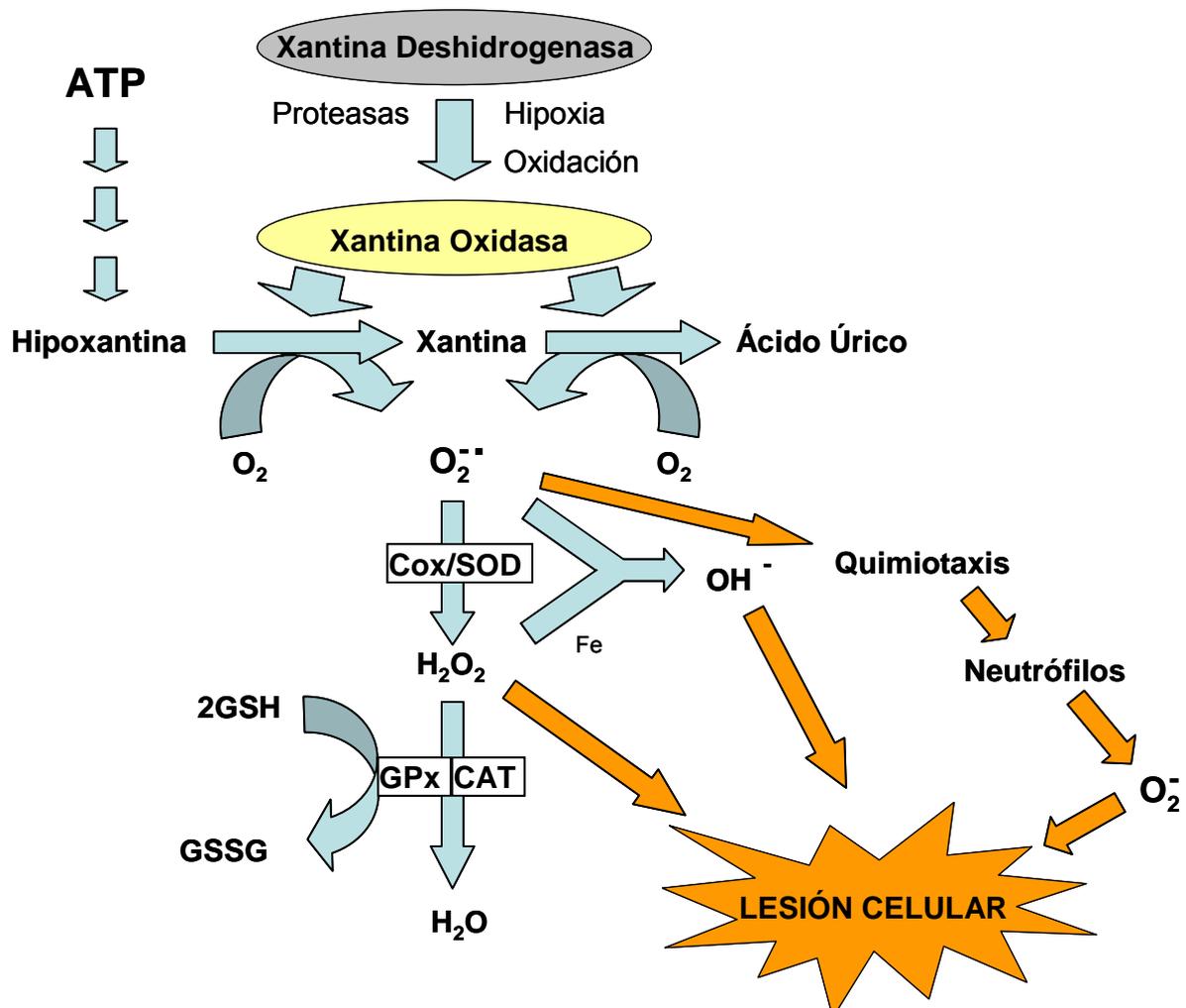


3.3.1.3.3. Vías metabólicas en las que intervienen.

En los mamíferos, la enzima cataliza la hidroxilación de hipoxantina a xantina, y de ésta a su vez para dar lugar a ácido úrico (figura 8). En el ser humano y los primates este es el último escalón en la degradación de las purinas, mientras que en otros mamíferos la vía de degradación de éstas sigue a alantoína, ácido alantoico, ácido glioxílico y finalmente ácido oxálico mediante la uricasa, que no se expresa en el hombre (Cutler, 1984).

La xantina oxidasa utiliza hipoxantina y oxígeno (como aceptor de electrones), para dar lugar a xantina (y eventualmente ácido úrico) y a radical superóxido, mientras que la xantina deshidrogenasa, que es la forma predominante en condiciones fisiológicas, utiliza xantina y NAD^+ (como aceptor de electrones) (Parks y cols., 1988). Esta última también es capaz de utilizar el oxígeno como aceptor de electrones, aunque tiene preferencia por el NAD^+ . En cambio, la xantina oxidasa sólo es capaz de utilizar el oxígeno como aceptor de electrones.

Figura 8.- Vía de degradación de las purinas.



Otra reacción que es catalizada por la XOR es la oxidación de NADH en presencia de oxígeno, produciendo radical superóxido. En el caso de XO y XDH de leche humana y de vaca se ha descrito que la actividad NADH oxidasa de la enzima puede ser relevante en cuanto a la producción de ERO *in vivo* (Harris y Massey, 1997). La producción de superóxido por la actividad NADH oxidasa de la XO de leche de vaca es 10 veces mayor que por parte de la XDH del mismo origen. Sin embargo, *in vivo* la proporción de XO tisular es de 1/4 de la de XDH. En procesos fisiopatológicos, entre ellos la isquemia-reperfusión, se produce una conversión de la XDH en XO y un aumento citosólico de NADH, incrementándose así la producción de superóxido a través de la XO. Debemos citar asimismo a Sanders y cols., que comprueban una mayor actividad NADH oxidasa y por tanto también una mayor producción de radical superóxido por la XO humana que por la de vaca (Sanders y cols., 1997).

Se sabe desde hace casi 100 años que la enzima cataliza además la reducción de nitrato a nitrito en condiciones anaeróbicas (Dixon y Thurlow, 1924) y en la misma línea se ha descubierto recientemente que la XO cataliza también la subsiguiente reacción de reducción del nitrito para la formación de NO tanto en condiciones aeróbicas como en hipoxia (Zhang y cols., 1998).

3.3.1.3.4. Distribución orgánica, celular y transporte de la xantina oxidasa.

La xantina oxidasa se localiza en el citoplasma celular y su distribución varía según los tejidos y según las especies. Se trata de una enzima que está ampliamente distribuida, siendo particularmente abundante en las células epiteliales de la glándula mamaria y en el endotelio capilar de diversos órganos. En humanos, el hígado y el intestino son los tejidos con mayor riqueza en actividad de XO, mientras que no se ha conseguido detectar actividad en algunas células como los eritrocitos.

La distribución dentro de la célula es básicamente uniforme, aunque tiende a acumularse cerca del núcleo o de la membrana en contacto con otras células, pudiendo ser los radicales libres producidos por la misma como activadores de señales a otras células o de factores de transcripción en el núcleo (Rouquette y cols., 1998).

Rouquette y cols. explican la presencia extracelular de la enzima mediante un mecanismo de secreción no clásico y posterior unión a glicosaminoglicanos de la superficie celular. Para utilizar la vía clásica necesitaría una glicosilación previa, además de la presencia de un péptido señal y la XOR carece de ambas características (Rouquette y cols., 1998).

La unión de la enzima a la superficie celular está respaldada por un aumento del daño producido en los órganos por la XO transportada por la sangre

(Terada y cols., 1992), y dicho daño se previene por inhibidores de la XO (Zimmerman y cols., 1988). Así pues, la XO liberada desde órganos isquémicos es capaz de producir efectos en órganos a distancia, como el pulmón (Weinbroum y cols., 1995). Los niveles plasmáticos de XO aumentan si además se administra una perfusión intravenosa de heparina (Tan y cols., 1993). La cantidad de XO unida a la membrana celular o presente en el espacio intersticial puede aumentar miles de veces, y desde ahí los productos de la reacción enzimática pueden actuar (Houston y cols., 1999). Esta unión a la luz vascular es una unión reversible, ya que tanto en humanos como en modelos de shock hemorrágico en ratas, la administración de heparina provoca el aumento de la cantidad de XO en plasma sin estar este aumento provocado por lesión adicional (Tan y cols., 1993). El desplazamiento de la unión de la XO ante la presencia de heparina se atribuye a la capacidad de ésta para unirse a sitios catiónicos de la XO, compitiendo así la heparina con el condroitín sulfato y otros glicosaminglicanos (Houston y cols., 1999).

Por otra parte, la unión de la XO a la superficie celular influye en las propiedades catalíticas, en la capacidad de producir agentes oxidantes y en la estabilidad de la propia XO (Radi y cols., 1997) y estos cambios se añaden al paso inmediato de XDH a XO al liberarse la enzima al plasma (Tan y cols., 1993). De forma que, ambos mecanismos aumentan la capacidad de producción de ERO por la enzima. Una vez unida a la membrana celular de las células endoteliales, la XO se puede incorporar al interior celular por endocitosis (Houston y cols., 1999).

A lo anteriormente citado se suma que el radical superóxido producido por la enzima unida a la superficie celular es más resistente a la neutralización por la SOD, por la repulsión que sufre debido a las fuerzas electrostáticas (Houston y cols., 1999). La rápida reacción con el óxido nítrico para formar peroxinitrito puede provocar disfunción vascular al disminuir la capacidad vasodilatadora del óxido nítrico.

Por último, citar que además de circular por el plasma de forma libre, la enzima también circula formando inmunocomplejos. De hecho, la actividad XO en plasma humano es escasamente detectable en condiciones normales (Giler y cols., 1975), en parte debido a que la XO humana forma inmunocomplejos con los anticuerpos IgM, siendo el 3% de estos anti-XO (Benboubetra y cols., 1997).

3.3.1.3.5. Regulación de la actividad xantina oxidasa.

Los inhibidores de la XO se pueden clasificar en análogos estructurales de sus substratos fisiológicos (purinas) y moléculas no análogas. Entre los análogos se encuentran el alopurinol, el oxipurinol, algunas pirimidinas y derivados del

ácido fólico como las pterinas. Entre los no análogos se encuentran el tungsteno, el metanol o el formaldehído. Ambos tipos de inhibidores parecen actuar en el lugar del molibdeno, interfiriendo su interacción con las purinas. El alopurinol y el oxipurinol son dos pirazolpirimidinas que se han mostrado como los más efectivos inhibidores de la XO tanto *in vivo* como *in vitro*.

El alopurinol se oxida a oxipurinol que se une de forma reversible pero muy potente al lugar de activación del molibdeno (Radi y cols., 1992). Es absorbido por el tracto intestinal en un 90% aproximadamente. Los niveles plasmáticos del alopurinol y oxipurinol presentan un pico a la hora y a las 3 h, respectivamente. Mientras que la vida media del alopurinol y oxipurinol, tras la administración oral, es de > 1 y ~ 20 h, respectivamente. Aproximadamente un 20% del alopurinol ingerido se elimina por las heces. La inhibición de la xantina oxidasa tras una sola dosis diaria es eficaz durante un periodo de unas 24 h (Murrell y Rapeport, 1986).

Por último, es de destacar que la actividad xantina oxidasa puede ser activada por fosforilación; y dado que las quinasas implicadas, como p38, están implicadas en el proceso de inflamación, ello sugiere que la XO juega un papel en la reacción inflamatoria. Además de p38, se ha visto que en la fosforilación de la XO está implicada otra quinasa, la CK2 (caseína quinasa II) (Kayyali y cols., 2001). Ésta es una proteína quinasa que juega un papel importante en la regulación de la replicación del DNA y en la transcripción así como en la regulación del crecimiento celular y del metabolismo. La quinasa p38 por sí sola no es capaz de fosforilar la XO, habiéndose especulado que el posible mecanismo de actuación es la interacción directa de p38 con la CK2 (Kayyali y cols., 2001).

No debemos olvidar, en relación con lo anterior, que la actividad xantina oxidasa es inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF- α), el interferón- γ (IFN- γ), la interleuquina-1 (IL-1) y la interleuquina-6 (IL-6), un patrón similar al de la respuesta de fase aguda. Estos mediadores aumentan la transcripción del RNA mensajero para xantina óxidoreductasa (Pfeffer y cols., 1994). Ghio y cols. sugieren la existencia de una proteína represora de vida media corta o una proteína lábil con actividad RNAsa que inhibe la expresión génica de esta enzima (Ghio y cols., 2002).

3.3.1.3.6. Xantina oxidasa y pancreatitis aguda.

Derivado de la capacidad de la forma oxidasa de la enzima para generar especies reactivas del oxígeno, la xantina oxidasa ha sido estudiada como mecanismo patofisiológico en el daño tisular por isquemia-reperfusión y muchas

otras enfermedades. En la pancreatitis aguda tiene un papel relevante tanto a nivel local como a nivel sistémico.

Como ya se ha señalado, se ha descrito que la activación del quimotripsinógeno a quimotripsina puede posteriormente convertir la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa (Enroth y cols., 2000) y éste es un proceso típico de las células acinares en la pancreatitis aguda. Alternativamente, la xantina oxidasa se formaría reversiblemente a partir de xantina deshidrogenasa por medio de la oxidación de sus grupos tiólicos (Stirpe y Della Corte, 1969). La inhibición de la xantina oxidasa produce efectos beneficiosos en la pancreatitis aguda. Se ha observado que el pretratamiento con alopurinol, inhibidor específico de la xantina oxidasa, reduce marcadamente la hiperamilasemia y el edema pancreático en la pancreatitis aguda experimental en el perro (Sanfey y cols., 1985). El tratamiento con alopurinol también previene el incremento de la concentración de MDA y mejora el edema, la necrosis y la inflamación en páncreas tras la inducción de pancreatitis necrotizante producida por L-arginina (Czako y cols., 2000).

Comparando dos métodos diferentes de pancreatitis aguda experimental como son la pancreatitis inducida por ceruleína y la inducida por taurocolato, podemos deducir que la xantina oxidasa es un factor principal responsable del estrés oxidativo encontrado en la pancreatitis inducida por taurocolato, mientras que el estrés oxidativo en el modelo de ceruleína es principalmente producido por el infiltrado neutrofílico en el páncreas (Closa y cols., 1994). Los neutrófilos pueden generar grandes cantidades de radical superóxido y peróxido de hidrógeno por activación de la NADPH oxidasa.

La xantina oxidasa puede contribuir al daño local del páncreas. Así, el superóxido generado por la xantina oxidasa causa *in vitro* daño a las células acinares pancreáticas (Tamura y cols., 1992), y los gránulos de zimógeno aislados son especialmente susceptibles a este estrés oxidativo (Schulz y Niederau, 1994). Es más, la composición lipídica de las membranas pancreáticas cambia durante la pancreatitis aguda experimental, incrementando la susceptibilidad de las membranas a la peroxidación lipídica inducida por la xantina oxidasa (Ferreira y cols., 2002).

Recientemente, Closa y colaboradores han demostrado que la xantina oxidasa está relacionada no solo con el daño pancreático sino también con la inflamación pulmonar asociada con la pancreatitis aguda experimental (Folch y cols., 1998). Durante los primeros estadios de la enfermedad, la enzima α -amilasa pasa de la ascitis al plasma y una vez dentro de la circulación promueve la liberación de la xantina oxidasa al hidrolizar los enlaces que posee la XDH/XOD con las glicoproteínas de las células endoteliales. Las enzimas proteolíticas convierten la xantina deshidrogenasa en su forma oxidasa contribuyendo al

incremento de xantina oxidasa circulante, que ha sido relacionada en el inicio del proceso inflamatorio sistémico. Por consiguiente, la elevada expresión de P-selectina, uno de los mayores mediadores de la infiltración neutrofílica en el pulmón, parece que es debida a un mecanismo dependiente de radicales libres generados por la xantina oxidasa (Folch y cols., 2000a; Granell y cols., 2004a). Nuestro grupo ha observado recientemente que inhibiendo la xantina oxidasa usando oxipurinol se previene parcialmente la elevación de la actividad mieloperoxidasa pero combinando el tratamiento con pentoxifilina, un inhibidor de la producción de TNF- α , se consigue prevenir casi completamente tanto el incremento de la actividad mieloperoxidasa como la infiltración leucocitaria (Pereda y cols., 2004).

3.3.1.4. Fagocitos activados.

Los fagocitos activados (neutrófilos, macrófagos, monocitos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 como uno de los mecanismos para defenderse de los microorganismos (Babior, 1978). En aquellas enfermedades inflamatorias como la pancreatitis aguda, estos fagocitos activados son una fuente importante de radicales libres que se producen en el lugar de la inflamación específicamente para la defensa del órgano atacado, pero pueden acabar dañando los tejidos y producir estrés oxidativo.

El mecanismo de producción se basa en la existencia de una NAD(P)H oxidasa asociada con el citocromo b-245 y una flavoproteína que actúan como la cadena de transporte de electrones. La región de unión al nucleótido se encuentra en la cara citoplasmática, mientras que en la parte exterior está la región formadora del superóxido (Liras y Carballo, 1996).

3.3.1.5. Otros.

Existe otra fuente de radicales libres que constituyen los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplasmático. Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P_{450} y b_5 , que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila y cols., 1981) y xenobióticos (Aust y cols., 1993). Bajo la denominación de citocromos P_{450} se engloba un número muy elevado de proteínas con grupos hemo ampliamente distribuidas entre los seres vivos. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberadas en la célula (Dolphin, 1988; Foster y Estabrook, 1993).

Los microsomas y peroxisomas son una fuente importante de peróxido de hidrógeno. Son un conjunto heterogéneo de vesículas membranosas que sedimentan a 100.000 g. Poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa para la degradación de ácidos grasos

y amino ácidos, que producen peróxido de hidrógeno (Boveris y cols., 1972). La catalasa peroxisomal metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno formado en los peroxisomas (Freeman y Crapo, 1982; Frei, 1994). Por otro lado, el citocromo P₄₅₀ tiene un papel importante en los microsomas en la detoxificación de xenobióticos (Philpot, 1991).

Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas. En todos estos casos, el radical superóxido es el radical primario formado en la reducción del oxígeno por estas moléculas. Asimismo, también se produce peróxido de hidrógeno como producto secundario a partir de la dismutación del radical superóxido bien espontáneamente, o bien catalizado enzimáticamente por la superóxido dismutasa (SOD).

Algunas enzimas como la óxido nítrico sintasa, la aldehído oxidasa, la dihidroorotato deshidrogenasa, la flavinproteín deshidrogenasa y la triptófano dioxigenasa, también generan radicales libres durante su ciclo catalítico (Aleman y Handler, 1967). Así mismo, existen enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, que producen radicales libres en el metabolismo de su sustrato, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (White y Heckler, 1990).

3.3.2. Fuentes exógenas.

La producción de ERO puede ser debida a la acción de radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) o a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (von Sonntag, 1994). También existen antineoplásicos como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos (Doroshov y Davies, 1983) que producen especies reactivas de oxígeno. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. Los factores ambientales tales como contaminantes aéreos fotoquímicos, la hiperoxia, los pesticidas, el humo del tabaco, los solventes, los anestésicos y los hidrocarburos aromáticos pueden ser otras fuentes de ERO. Estos agentes o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Trush y cols., 1982).

4. ESTRÉS OXIDATIVO.

4.1. Concepto de estrés oxidativo.

Como hemos visto, en la vida celular la producción de cierta cantidad de radicales libres es normal e inevitable (Slater, 1984). Estas especies tan reactivas serían capaces de causar un daño oxidativo si no fuese porque existe una cantidad de mecanismos antioxidantes que evitan dicho daño. El concepto de estrés oxidativo fue introducido por Sies en 1986, y se define como un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes en favor de las primeras (Sies, 1986). El estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez. En situaciones de estrés oxidativo se produce oxidación de biomoléculas causando daño tisular, dado que la capacidad antioxidante se ha visto desbordada. La administración de antioxidantes estaría recomendada en estos casos (Ames, 1983).

4.2. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas. Índices de estrés oxidativo.

La oxidación se produce a nivel de las cuatro principales biomoléculas, lípidos, glúcidos, ácidos nucleicos y proteínas. Los radicales libres atacan a las biomoléculas y son capaces de oxidarlas causando pérdida de función, acumulación de moléculas oxidadas, mutaciones, etc..

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Se utilizan fundamentalmente los productos de la oxidación de las diferentes biomoléculas.

4.2.1. Daño oxidativo a lípidos, proteínas, glúcidos y DNA.

De las cuatro principales tipos de biomoléculas las más susceptibles a ser dañados oxidativamente son los lípidos, y dentro de ellos los ácidos grasos poliinsaturados (Cheeseman y Slater, 1993). Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), el peróxido (ROO^{\bullet}), el alcóxido (RO^{\bullet}) y el alquílico (R^{\bullet}).

El mecanismo se denomina peroxidación lipídica y comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Frei, 1994; Halliwell, 1994). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, $R-COO^*$. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, se forma un radical alquílico ($R'-CH^*$) y un peróxido lipídico ($R-COOH$), con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell, 1994). Ciertos componentes de la defensa antioxidante de las células restringen la extensión de esta reacción en cadena, siendo incluso en ocasiones capaces de detenerla completamente (Vladimirov, 1986).

De esta manera, un solo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, principalmente aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonenal, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Halliwell, 1991; Halliwell, 1994).

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, principalmente a nivel del grupo carbonilo y sobre todo por el radical hidroxilo (Stadtman y cols., 1992). La tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (Davies, 1987). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica.

Se ha propuesto que la oxidación de enzimas mediada por radicales libres, es un paso de marcaje dentro del recambio proteico (Stadtman y cols., 1992) Se ha observado que muchas proteasas comunes degradan proteínas oxidadas con mayor preferencia que las formas no oxidadas (Davies, 1987).

Los glúcidos reaccionan con facilidad con los radicales hidroxilo. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini y cols., 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres dando lugar a procesos degenerativos. Así, los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa (Greenwald y Moy, 1980).

El daño al DNA por radicales libres puede ocurrir de dos modos principales: mediante reacción con los residuos de desoxirribosa, que no suele ser crítico, o mediante reacción con las bases del DNA.

La adición a las bases del DNA es más habitual que la primera, y da lugar a una gran variedad de productos derivados. En presencia de oxígeno, los aductos de purinas con radicales libres pueden sufrir en ciertos casos una reconversión a la purina inicial (Breen y Murphy, 1995). El número de bases modificadas diferentes encontradas en el DNA tras un ataque oxidativo supera la veintena. La oxidación de la desoxiguanosina a 8-oxoguanosina es una de las lesiones más frecuentes, y reviste gran importancia por su alto efecto mutagénico (Shibutani y cols., 1992). No obstante, el DNA dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina (Ames y cols., 1993).

4.2.2. Cociente GSSG/GSH como índice de estrés oxidativo.

El glutatión (γ -glutamil cisteinil glicina) es un tripéptido que desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, sobre todo relacionadas con la protección antioxidante de las células (Viña y cols., 1990). El grupo activo es el sulfhidrilo del residuo de cisteína, por lo que el glutatión puede ejercer su papel protector cuando se presenta en su forma reducida (GSH). Dos moléculas de GSH pueden oxidarse cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí dando lugar la forma disulfuro (GSSG). Por ello, un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión, aumentando el cociente GSSG/GSH (Sies, 1986). Sin embargo, existen problemas metodológicos importantes en la determinación correcta del GSSG. En condiciones fisiológicas, los niveles de GSH son de dos a tres órdenes de magnitud mayores que los de GSSG (Kosower y Kosower, 1978). Además, el GSH se autooxida con facilidad a GSSG, sobre todo a pH neutro (Asensi y cols., 1994). Por tanto, una pequeña oxidación del GSH supone un aumento muy importante del GSSG, con el falseamiento consiguiente del índice GSSG/GSH. Estos problemas se han conseguido solucionar gracias al método propuesto por nuestro grupo, consistente en el bloqueo del grupo tiol con N-etilmaleimida inmediatamente después de la extracción y posterior análisis del GSSG por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (C.L.A.R.) (Asensi y cols., 1994).

5. ANTIOXIDANTES.

Puesto que continuamente la maquinaria celular está produciendo especies reactivas del oxígeno, necesita poseer sistemas de contención de estos pro-oxidantes. Se trata de las sustancias antioxidantes. Halliwell en 1995 definió antioxidante como "cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato" (Sies, 1993; Halliwell y Gutteridge, 1995). Bajo el punto de vista bioquímico los podemos dividir en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos. Utilizaremos esta clasificación para describir las principales sustancias antioxidantes de la célula (figura 9).

5.1. Antioxidantes enzimáticos.

5.1.1. Superóxido dismutasas.

Son un conjunto de metaloproteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Están presentes en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno, incluso en algunas bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas (Hassan, 1989).

Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (McCord y Fridovich, 1969). La superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord y cols., 1974; Fridovich, 1978).



La catálisis de la reacción de dismutación es espontánea, pero llevada a cabo por la enzima superóxido dismutasa, se incrementa la velocidad del orden de 10.000 veces (Fridovich, 1974).

En las células de mamífero existen las isoformas ligadas al cobre y zinc, y las isoformas ligadas al manganeso. Las isoformas ligadas al cobre y al zinc se

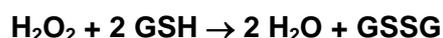
localizan en el citoplasma y en el núcleo, y a escala tisular se encuentran a elevadas concentraciones en hígado, cerebro y testículos, y en menor proporción en eritrocitos, pulmón y páncreas. Extracelularmente aparece otra isoforma ligada al cobre y zinc caracterizada por su gran peso molecular (Marklund y cols., 1982). Aunque esta isoforma es detectable en plasma, se localiza principalmente en la matriz extracelular, probablemente para interceptar el daño causado por el superóxido que liberan neutrófilos y macrófagos al ejercer su función (Fridovich, 1997).

La isoforma ligada al manganeso en mamíferos se encuentra mayoritariamente en la matriz mitocondrial (Weisger y Fridovich, 1973; Kinnula y cols., 1995) y en menor medida en el citosol. Su presencia en la mitocondria es de gran importancia, puesto que la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en las células (Boveris y Chance, 1973).

5.1.2. Glutación peroxidasas.

Son las principales enzimas eliminadoras de peróxidos alquílicos y peróxido de hidrógeno. Se trata también de enzimas que se comportan como antioxidantes primarios. Convierten el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos en moléculas inofensivas (Chance y cols., 1979). Hay dos tipos de glutatión peroxidasas, y ambas requieren glutatión reducido como dador de equivalentes reductores:

Por un lado está la glutatión peroxidasa selenio dependiente. Es una proteína tetramérica con cuatro átomos de selenio, que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986). Su centro activo contiene una cisteína en la que el azufre ha sido sustituido por selenio (Forstrom y cols., 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, 1986).



Por otro lado, la glutatión peroxidasa no selenio dependiente sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986). La mayor parte de la actividad glutatión peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

5.1.3. Catalasa.

La catalasa participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance y cols., 1979).

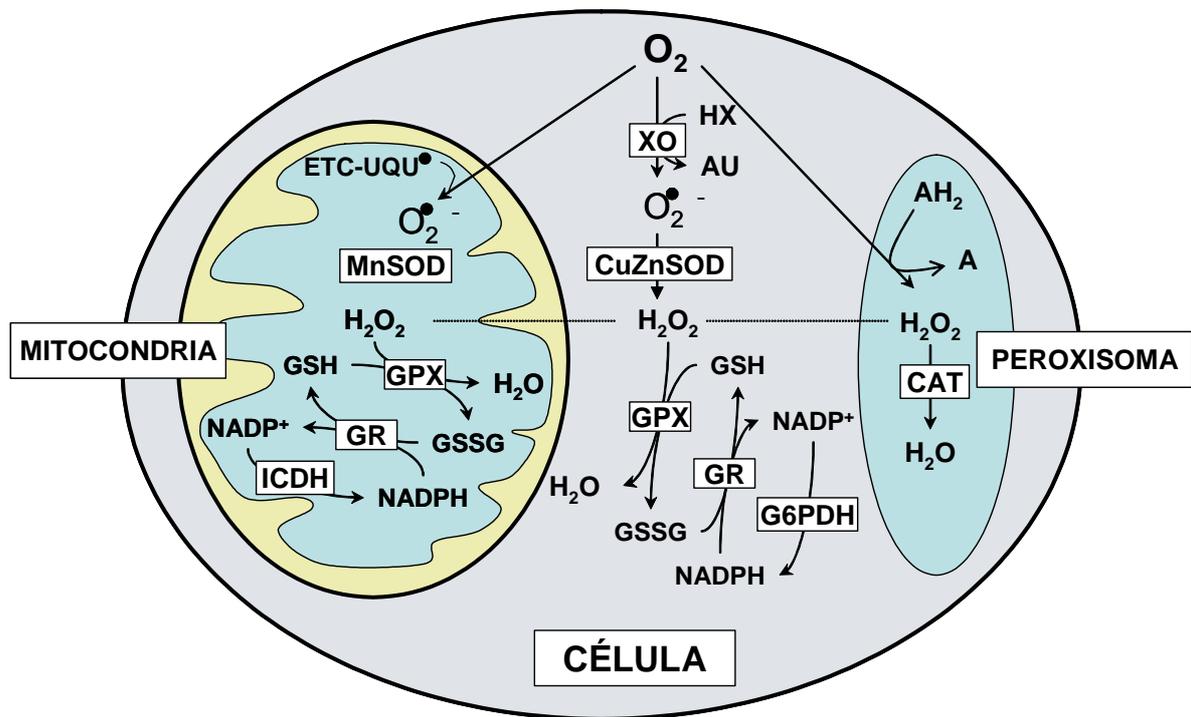


También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (Aruoma y cols., 1989).



La catalasa se halla principalmente en los peroxisomas (Tolbert y Essner, 1981), si bien en años recientes se ha descrito cierta actividad catalasa también en mitocondrias y citosol (Rodríguez y cols., 2000).

Figura 9.- Sistemas antioxidantes celulares.



5.2. Antioxidantes no enzimáticos.

Son aquellas moléculas que reaccionan directamente sin que sea necesaria ninguna intervención enzimática con las especies reactivas o con los productos de reacción de éstas. Sin embargo, en ocasiones pueden participar también en procesos antioxidantes enzimáticos. Entre los antioxidantes no enzimáticos encontramos al glutatión, la vitamina C, la vitamina E, los β -carotenos y el ácido úrico.

5.2.1. El glutatión.

Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos (Jocelyn, 1973). Su concentración intracelular es tan elevada como la concentración de glucosa, que es de las moléculas más comunes dentro de la célula (Viña y cols., 1978).

Fue descubierto en el siglo diecinueve por deRey-Pailhade (DeRey-Pailhade, 1888) en Mompelien, Francia. Su estructura fue estudiada por Hopkins,

que pensaba que era un dipéptido compuesto de glutamato y cisteína. Harrington y Mead, en 1935, describieron finalmente la estructura correcta de la molécula: γ -glutamil cisteinil glicina. El nombre de glutatión se lo designó Hopkins en 1921.

Tras la publicación en la revista Nature de un artículo de E.M. Kosower y N.S. Kosower (Kosower y Kosower, 1969) se estimuló enormemente la investigación sobre esta molécula. Hasta la fecha existían muy pocos estudios sobre el glutatión. En la actualidad, hay más de 40,000 artículos publicados sobre esta molécula. Incluso se han publicado libros monográficos sobre el glutatión. Tiene numerosas funciones fisiológicas derivadas de su estructura. Una de las principales es la de proteger a la célula contra los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, así como proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones.

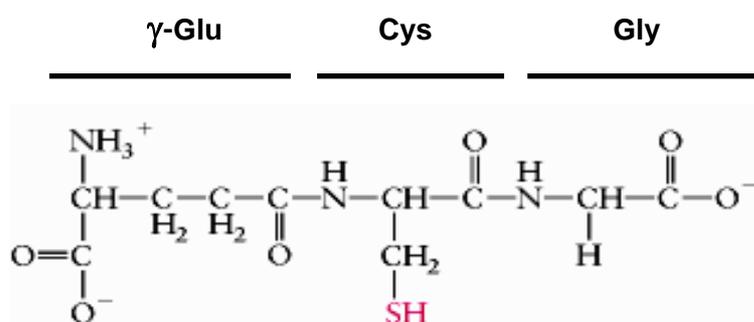
5.2.1.1. Estructura química del glutatión.

Tiene muchas numerosas e importantes funciones fisiológicas y metabólicas que se derivan de su peculiar estructura (figura 10) (Viña y cols., 1990):

1.- Presenta un grupo tiol libre (-SH) que corresponde al aminoácido de cisteína, que es el que interviene en las reacciones redox del glutatión.

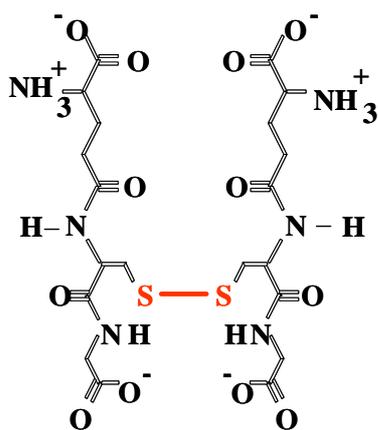
2.- Posee un enlace muy particular, el γ - glutamilo, que le hace resistente a la degradación por las peptidasas habituales de la célula. En la actualidad, sólo se conoce una enzima capaz de hidrolizarlo, la γ -glutamil transpeptidasa, que está situada en la membrana celular (Viña y cols., 1992a).

Figura 10.- Estructura química del glutatión.



El glutatión se puede encontrar de dos formas, según su estado de óxido-reducción: como GSH o glutatión reducido, o como GSSG o glutatión oxidado. El GSSG está compuesto por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas (figura 11).

Figura 11.- Estructura química del GSSG.



5.2.1.2. Propiedades físico-químicas del glutatión.

El glutatión, gracias a su grupo tiol, puede intervenir en reacciones de tipo redox intercambiando electrones a través del azufre de la cisteína que contiene en su estructura (Kosower y Kosower, 1978). Por ello, puede actuar de las siguientes formas:

- 1.- Reacción directa con un radical libre.

El GSH reacciona con un radical libre formándose el radical GS^\bullet . Este radical es estable y persiste hasta encontrar otro radical y formar una molécula de GSSG.



- 2.- Intercambio tiol – disulfuro.

Puede reaccionar estando en forma oxidada con otro tiol uniéndose una molécula de glutatión al tiol formando GS⁻.



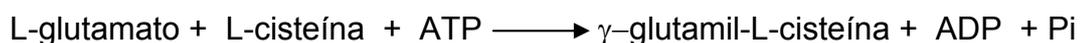
3.- Oxidación dieléctrica.

Se produce a través de la formación de un intermediario, seguida por la sustitución de una molécula adecuada. Este mecanismo es uno de los empleados para deplecionar GSH de forma no enzimática:



5.2.1.3. Síntesis del glutatión y su regulación.

El glutatión reducido (GSH) se sintetiza a partir de sus aminoácidos en el citosol de todas las células de mamífero (Meister, 1988). En la síntesis de GSH intervienen dos enzimas. La primera es la γ -glutamil cisteína sintetasa (GCS) (figura 12), que da lugar a la γ -glutamil cisteína a partir de L-glutámico y L-cisteína. En situaciones fisiológicas, el paso limitante para la síntesis de GSH es la disponibilidad de cisteína (Tateishi y cols., 1974b; Tateishi y cols., 1977). La síntesis de glutatión está regulada por retroalimentación, ya que el GSH inhibe la GCS (Richman y Meister, 1975).



El segundo paso de la síntesis de GSH (figura 12, reacción 2) está catalizado por la glutatión sintetasa (GS), que une una glicina a la γ -glutamil cisteína. La enzima glutatión sintetasa se compone de dos subunidades idénticas y no está sujeta a inhibición por retroalimentación negativa por el GSH (Oppenheimer y cols., 1979). En el riñón de la rata se glicosila pero el papel de la

glicosilación de la enzima en la regulación de su actividad es desconocido (Oppenheimer y cols., 1979; Lu, 1999).

5.2.1.3.1. γ -glutamil cisteína sintetasa.

La enzima GCS se compone de una subunidad catalítica pesada de 73 kDa y de una subunidad reguladora ligera de unos 30 kDa, que son codificadas por diferentes genes en hombres que en ratas (Gipp y cols., 1992; Huang y cols., 1993). La subunidad catalítica presenta la inhibición por retroalimentación ejercida por el GSH (Seelig y cols., 1984). La regulación fisiológica de la actividad de la GCS recae en la disponibilidad de L-cisteína (Tateishi y cols., 1974a) y en la inhibición que ejerce el GSH sobre la enzima (Meister, 1988; Lu, 1999). La cisteína intracelular se acerca a la K_m de la GCS (de 0,1 a 0,3 mM en humanos y ratas), mientras que los niveles de glutamato son varias veces mayores que el valor de K_m de la GCS para el glutamato (1.8 mM) (Lu y cols., 1992). Así los niveles de cisteína determinan la tasa de síntesis en condiciones fisiológicas.

Ambas subunidades de la GCS son reguladas a nivel transcripcional por el estrés oxidativo (Lu, 1999), y numerosos agentes que inducen estrés oxidativo como el peróxido de hidrógeno, las quinonas, las radiaciones ionizantes, el TNF- α o el 4 hidroxil-2-nonenal elevan la actividad de la GCS así como la transcripción de la subunidad pesada de la enzima (Cai y cols., 1997; Lu, 1999). La transcripción de la subunidad ligera de la GCS está también incrementada en respuesta de tert-butilhidroquinona o de 4-hidroxil-2-nonenal (Cai y cols., 1997; Lu, 1999). Además, el 4-hidroxil-2-nonenal es capaz de estabilizar el mRNA de las dos subunidades de la GCS (Liu y cols., 1998).

La elevación de la transcripción de ambas subunidades de la GCS por el estrés oxidativo está mediada por diferentes factores de transcripción, como el factor nuclear kappa B, SP-1, proteína activadora-1 (AP-1), proteína activadora-2 (AP-2) y elementos de respuesta antioxidante o elementos de respuesta electrofílica.

La regulación hormonal de la expresión de la GCS tiene una especial relevancia fisiológica. La fenilefrina, el glucagón, o el dibutilil AMPc inhiben la actividad de la GCS, que hace disminuir la síntesis de glutatión y conlleva la depleción de glutatión en hepatocitos de rata (Estrela y cols., 1988; Lu y cols., 1991). La pérdida de la actividad de la GCS inducida por estas hormonas de estrés está mediada por la fosforilación de la subunidad catalítica debida a la activación de la proteína quinasa A, la proteína quinasa C o calmodulín quinasa Ca^{2+} (Sun y cols., 1996). De esta manera, la respuesta al estrés disminuye la síntesis

de GSH, incrementándose la disponibilidad de cisteína para la síntesis de proteínas de estrés (Lu, 1999).

Contrastando con esta respuesta aguda, la insulina o la hidrocortisona necesitan varias horas para incrementar la actividad de la GCS y por tanto para elevar los niveles de glutatión en los hepatocitos de rata (Lu y cols., 1992). En estos casos, el incremento de la GCS está mediado por un aumento en la transcripción del gen que codifica la subunidad catalítica de la enzima. Se ha descrito depleción de glutatión y actividad de GCS baja en ratas tratadas con estreptozotocina o en ratas adrenalectomizadas, mientras que la administración de glucocorticoides no tiene efecto en la actividad de la GCS o en los niveles de glutatión en ratas “sham-operated” (Lu y cols., 1992). Así, estas hormonas se requieren para la normal expresión de la GCS y mantenimiento de los niveles de GSH, pero la regulación de los niveles de glutatión durante el estrés parece que ocurre en dos fases: al principio algunas hormonas de estrés como el glucagón o la fenilefrina, disminuyen los niveles de glutatión a corto plazo, y después otras hormonas de estrés como el cortisol, repone los niveles de glutatión a medio y largo plazo.

Hay una inducción coordinada de las subunidades de GCS y la glutatión sintetasa por los agentes que deplecionan glutatión, como es el dietilmaleato, la butionina sulfoximina o la tert-butilhidroquinona (Huang y cols., 2000). Además, el factor de transcripción AP-1 se requiere para esta inducción coordinada así como la expresión basal de GCS y de la glutatión sintetasa (Yang y cols., 2002). En el carcinoma hepatocelular, se ha descrito un incremento en los niveles de mRNA tanto de la subunidad catalítica y de glutatión sintetasa que conlleva niveles altos de glutatión. Estos niveles altos de glutatión facilitan la proliferación celular (Huang y cols., 2001).

5.2.1.4. Degradación del glutatión, ciclo del γ -glutamilo.

El conjunto de las seis reacciones que participan en la síntesis y degradación del glutatión constituye el llamado ciclo del γ -glutamilo y fue postulado por Meister a mediados de los setenta (Meister y Anderson, 1983).

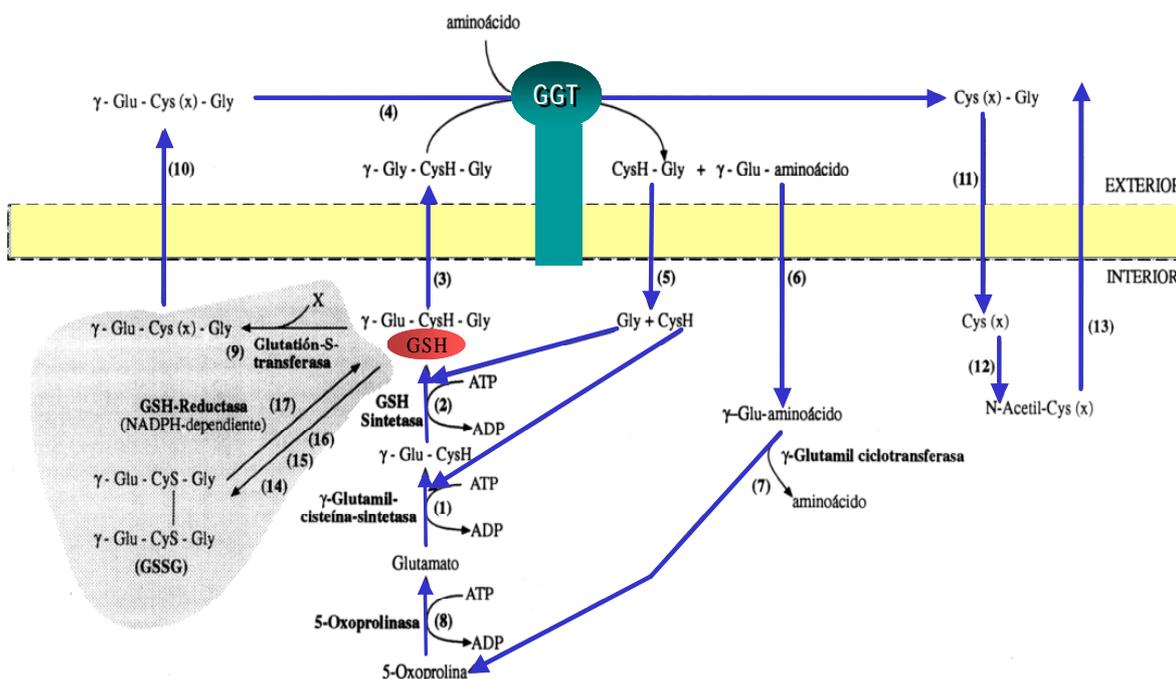
Tras la síntesis de glutatión mediante la GCS y la glutatión sintetasa, el glutatión es utilizado o degradado. La catabolización del glutatión se realiza en parte dentro de la célula y en parte fuera de la misma. El glutatión se exporta fuera de la célula por medio de un transportador específico. Comienza entonces la acción de la γ -glutamil transpeptidasa (GGT), que cataliza dos tipos de reacciones: a) transpeptidación, en la que la parte γ -glutamilo se transfiere a un aceptor, que puede ser el mismo GSH; b) hidrólisis, en la que se hidroliza el

enlace γ -glutamilo. Los substratos de la enzima son el GSH, el GSSG, el GSH S-sustituido y otros compuestos del γ -glutamilo (Meister y Anderson, 1983).

La actividad GGT se localiza en la superficie externa de las células (Meister y Anderson, 1983). Cuando el GSH interacciona con la membrana, la GGT forma el γ -glutamil aminoácido, que entra al interior de la célula a través de un transportador específico. La γ -glutamil ciclotransferasa (figura 12, reacción 4) hidroliza el γ -glutamil aminoácido, liberando el aminoácido y 5-oxo-L-prolina (Meister y Anderson, 1983). La oxoprolinasa (figura 12, reacción 7) cataliza la hidrólisis dependiente de ATP de la oxoprolina, liberando glutamato. Una dipeptidasa (figura 12, reacción 6) hidroliza la cisteinilglicina formada por la GGT (Meister y Anderson, 1983).

El ciclo de γ -glutamilo postulado por Meister (Meister, 1973) presentado como un mecanismo de transporte de aminoácidos presenta problemas importantes. El mayor es el problema energético. Se requiere el uso de tres moléculas de ATP por giro del ciclo, de manera que se gastan tres moléculas de alta energía por cada captación de un aminoácido. A favor del ciclo está la evidencia que al añadir *in vivo* γ -glutamil transpeptidasa se causa un descenso de la transferencia de aminoácidos al interior de la célula. Existe una hipótesis que sugiere que el ciclo de γ -glutamilo aparte de explicar la síntesis y degradación del glutatión también podría actuar como generador de señales que activarían el transporte de aminoácidos (Viña y cols., 1989b).

Figura 12.- Ciclo del γ -glutamilo.



El recambio de glutatión se debe considerar como un proceso multiorgánico. De hecho, en un órgano como el hígado en que la síntesis de glutatión es muy activa, la degradación es muy lenta debida a la baja actividad de la γ -glutamil transpeptidasa. Sin embargo, en riñón la γ -glutamil transpeptidasa está muy elevada. Por tanto, el ciclo del γ -glutamilo debe ser considerado como un ciclo multiorgánico en el que la parte sintética sucede principalmente en el hígado mientras que la parte catabólica sucede principalmente en riñón de entre otros órganos.

5.2.1.5. Precursores del glutatión.

La disponibilidad de L-cisteína es el factor limitante para la síntesis de glutatión en condiciones fisiológicas. La cisteína proviene de la dieta, de la proteólisis o alternativamente es sintetizada de la metionina por medio de la vía de transulfuración (Viña y cols., 1996). El hecho que el ayuno induce una caída de los niveles de GSH del 50% en ratas control subraya la importancia del estatus nutricional en la síntesis de GSH. De hecho, el ayuno durante 48 h produce una marcada depleción de glutatión en el hígado y los niveles se restauran al alimentarse normalmente (Tateishi y Sakamoto, 1983). Además, los niveles hepáticos de glutatión se relacionan íntimamente con el contenido de cisteína y/o de cistina de la dieta.

La cisteína entra en la célula utilizando transportadores específicos para aminoácidos neutros (Bannai, 1984). En hepatocitos se transporta principalmente por el sistema ASC sodio dependiente, y también está sujeto a inhibición cis y estimulación trans por los otros substratos de este sistema (Kilberg y cols., 1979; Bannai, 1984). La cistina se transporta en la forma aniónica por el transportador Xc sodio independiente, siendo el glutamato el único otro substrato (Bannai, 1984). A pesar que este sistema no se expresa en hepatocitos normales, se induce por la depleción de glutatión producida por agentes electrofílicos (Bannai y cols., 1989).

La vía de transulfuración ocurre en varios tejidos, pero principalmente en el hígado. Esta vía incluye cinco pasos:

- 1- Activación de la metionina a s-adenosil metionina
- 2- Desmetilación
- 3- Eliminación de la fracción s-adenosil para formar homocisteína.

4- Formación de cistationina de la homocisteína y serina

5- Ruptura de la cistationina para dar cisteína y β -ketobutirato.

El paso más importante de esta secuencia es el primero, que está catalizado por la metionina s-adenosil transferasa, y el último, que es irreversible y está catalizado por la enzima β -cistationasa.

La vía de transulfuración es escasa o incluso ausente en muchas condiciones fisiológicas y patológicas que implican depleción de glutatión. Está bloqueada en la cirrosis hepática, donde la depleción de glutatión se asocia con baja expresión y baja actividad de la metionina adenosiltransferasa, de la cistationina β -sintasa y de la β -cistationasa (Horowitz y cols., 1981; Serviddio y cols., 2004). El caso de la hiperhomocisteinemia es de especial relevancia clínica debido a la deficiencia en cistationina b-sintasa y conlleva retraso mental y disfunción trombovascular (Finkelstein, 2000). La actividad β -cistationasa está reducida dramáticamente y llega a ser la tasa limitante de la síntesis de glutatión en la vida fetal (Pallardo y cols., 1991), en los prematuros (Vina y cols., 1995), en el estrés quirúrgico (Viña y cols., 1992b), en el envejecimiento (Ferrer y cols., 1990) y en el sida (Viña y cols., 1986). Para reestablecer los niveles de glutatión en estas situaciones se debe utilizar N-acetil cisteína como precursor de cisteína ya que la vía de transulfuración no es capaz de aportar la suficiente para la síntesis de glutatión (Sastre y cols., 1994). Sin embargo, la dosis diaria de N-acetil cisteína en tratamientos crónicos debe ser elegida con cuidado para prevenir la acumulación de cisteína intracelular. Además, la cisteína libre puede sufrir auto-oxidación generando radicales libres (Viña y cols., 1983).

El glutatión monoetil éster ha sido también usado frecuentemente en la investigación para restaurar rápidamente los niveles intracelulares de GSH. La desventaja de usar el glutatión éster como terapia para enfermedades asociadas con depleción de glutatión es que proporciona intracelularmente cantidades equimoleculares de etanol junto con el GSH.

5.2.1.6. Transporte de glutatión.

El transporte por la membrana juega un papel clave en la renovación interorgánica del tripéptido. Hay que tener en cuenta la corta vida media del glutatión en el plasma sanguíneo, sólo unos minutos en ratas y humanos (Viña y cols., 1983). El hígado es uno de los órganos principales de síntesis de glutatión y de liberación del mismo al plasma mientras que el riñón es el principal órgano que lo elimina de la circulación (Griffith y Meister, 1979; Haberle y cols., 1979).

El eflujo de glutatión sinusoidal es el principal determinante de los niveles de glutatión, de cisteína y de cistina, así como del estatus de tiol-disulfuro en el plasma sanguíneo (Ookhtens y Kaplowitz, 1998). De hecho, la mayor tasa de eflujo de glutatión se realiza en los hepatocitos a través de la membrana sinusoidal ($15 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ hígado de rata) siendo la tasa de excreción biliar mucho más baja ($1\text{-}3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ hígado de rata). El transporte de glutatión a través de la membrana sinusoidal es sodio dependiente y es unidireccional en condiciones fisiológicas, es decir, no hay recaptación de GSH o de GSSG por los hepatocitos intactos (Hahn y cols., 1978). El eflujo de glutatión puede también ocurrir en el intercambio para la captación de compuestos γ -glutamilo y aniones orgánicos (García-Ruiz y cols., 1992). La adrenalina, la fenilefrina y el glucagón incrementan el eflujo de GSH por el hígado a través de la membrana sinusoidal (Lu y cols., 1990). De esta forma, la liberación de glutatión por el hígado puede inducirse durante el estrés para abastecer las demandas incrementadas de otros tejidos (Pyke y cols., 1986).

La excreción biliar se produce usando un sistema de transporte canalicular de gradiente electrogénico sodio independiente y ATP independiente. Tiene inhibición cis y estimulación trans por ciertos aniones orgánicos y es inducido por fenobarbital (Fernández-Checa y cols., 1993). La mitocondria no puede sintetizar glutatión, y el pool mitocondrial de GSH proviene del citosol, atravesando la membrana mediante un transportador mitocondrial. Este transportador, identificado en la mitocondria de hígado de rata, es diferente de los transportadores canaliculares y sinusoidales (García-Ruiz y cols., 1995). La ingesta crónica de etanol dificulta el transporte mitocondrial de GSH y presenta depleción mitocondrial de glutatión (Fernández-Checa y cols., 1991). El causante de la disminución del transporte de glutatión parece ser un incremento de la viscosidad de las membranas mitocondriales debido al alto contenido en colesterol (Lluis y cols., 2003).

Bajo condiciones fisiológicas, hay una excreción muy baja de GSSG ($0,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ hígado de rata) en la bilis. El GSH y el GSSG se liberan también de los tejidos extrahepáticos, como el corazón, a pesar que la liberación es mucho menor que por el hígado (Ishikawa y Sies, 1984). Los eritrocitos presentan dos sistemas de transporte para exportar el GSSG y ambos son ATP dependientes, pero no poseen capacidad de transportar GSH (Srivastava y Beutler, 1969; Kondo y cols., 1981).

El estrés oxidativo incrementa la liberación de GSSG por las células, los eritrocitos y los tejidos, como el hígado, el pulmón y el corazón (Sies y Akerboom, 1984). Los agentes prooxidantes aumentan la cantidad de excreción de GSSG en la bilis de forma paralela a la concentración de GSSG intracelular (Sies y Akerboom, 1984). Parece que la concentración de GSSG en la bilis está mediada

por un transporte activo, y sucede contra gradiente de concentración. La baja capacidad para eliminar GSSG de otros tejidos, como el corazón, puede exponerlos a sufrir estrés oxidativo.

El eflujo de GSSG se inhibe por glutatión-s conjugados en el hígado, en el corazón y en los eritrocitos (Ishikawa y Sies, 1984). En concordancia, un translocador común se relaciona con el transporte tanto del GSSG como de los conjugados de glutatión. Además, la formación de estos conjugados puede contribuir a la acumulación de GSSG durante estrés oxidativo.

La actividad del transportador sinusoidal de GSH está también influenciada por el estatus de tiol-disulfuro (Lu y cols., 1994). La oxidación de tioles favorece el transporte hacia dentro por la inhibición del eflujo y consecuentemente, cambia la dirección del transporte de GSH por medio de este transportador.

Se ha observado captación de GSH por el riñón, el pulmón y por las células intestinales (Hagen y cols., 1986; Lash y cols., 1986). Cerca del 80% del GSH plasmático presente en la arteria renal es extraído tras un único paso por el riñón. Esta capacidad de eliminación es en parte debida al alto contenido en actividad GGT que posee dicho órgano, localizada principalmente en el lado luminal del borde en cepillo de la membrana (Horiuchi y cols., 1978). El GSH presente en la filtración glomerular se degrada a sus aminoácidos constituyentes, que son reabsorbidos en la membrana luminal. La filtración glomerular y posterior rotura del GSH por la γ -glutamil transpeptidasa constituye un 20-30% de la extracción renal (Griffith y Meister, 1979). La captación de GSH renal también se realiza a través de la membrana basolateral por un sistema de transporte de GSH dependiente de sodio (Lash y Jones, 1984).

Se han visto transportadores sodio dependientes y sodio independientes en el epitelio del cristalino, en células de Muller retinales, en células epiteliales cerebrales y en astrocitos (Kannan y cols., 1996; Kannan y cols., 1999; Kannan y cols., 2000). El transportador sodio dependiente controla la captación de GSH, mientras que el transportador sodio independiente parece estar principalmente relacionado con el eflujo de GSH. Es interesante conocer que estos sistemas de transporte permiten el paso de glutatión a través de la barrera hematoencefálica *in vivo* (Kannan y cols., 1992).

5.2.1.7. Localización del GSH, glutatión mitocondrial, nuclear y endoplasmático.

Las funciones tan dispares que ejerce el glutatión (ver siguiente apartado) indican que el nivel y el estado redox no debe ser igual en los diferentes compartimentos celulares. Usando técnicas de separación celular, se ha puesto en evidencia la rica variedad de niveles de glutatión. De interés especial es la

distribución del glutatión en la mitocondria, en el retículo endoplasmático y en el núcleo.

La importancia del glutatión mitocondrial fue puesta en relieve por Jocelyn y Kamminga (Jocelyn y Kamminga, 1974). La distribución actual y los precisos niveles de glutatión en la mitocondria en relación con el citosol se describió por Sies y sus colaboradores (Wahllander y cols., 1979). El glutatión tiene diferente tasa de renovación en la mitocondria que en el citosol (Griffith y Meister, 1985). Además, no es sintetizado dentro de la mitocondria, pero es transportado en estos orgánulos por un transportador específico del citosol (ver apartado anterior) El glutatión mitocondrial tiene importantes funciones celulares tanto en la patología como en la fisiología normal de la célula (Linnane y cols., 1989). De especial importancia es su función en el envejecimiento, que fue postulado por primera vez por Miquel y colaboradores (Miquel y cols., 1980). El GSH se encuentra ligeramente disminuido con la edad en el citoplasma, en una proporción de aproximadamente el 30% de todo el glutatión celular. Sin embargo, cuando se determina el glutatión en la mitocondria, se puede observar que con la edad disminuye marcadamente en dicho orgánulo y que la bajada que experimenta explica la pérdida observada de glutatión en toda la célula (Sastre y cols., 1996). Además, existe una correlación entre el glutatión mitocondrial y el incremento de estrés oxidativo en el DNA de la mitocondria (de la Asuncion y cols., 1998). El glutatión mitocondrial tiene un papel importante en muchas otras enfermedades, como en el sida (principalmente debido a la toxicidad de los agentes antirretrovirales) y también en relevantes estados fisiológicos. Por ejemplo, la vía mitocondrial de la apoptosis celular se dispara por la oxidación del glutatión mitocondrial (Esteve y cols., 1999).

El retículo endoplasmático es otro compartimento celular en el que el glutatión juega un papel importante, particularmente debido a su relevancia en el plegamiento de la proteína secretada. Las primeras observaciones se realizaron por Trimm (Trimm y cols., 1986), que describió que la oxidación del glutatión endoplasmático conlleva liberación de calcio por el retículo. Un artículo muy importante publicado en Science por Hwang y colaboradores (Hwang y cols., 1992), utilizando un ingenioso método para determinar el estado redox del glutatión en los compartimentos celulares, demuestra que la tasa de glutatión oxidado y glutatión reducido (GSSG/GSH) citosólico está alrededor de 60. Sin embargo, el glutatión está muy significativamente oxidado en el retículo endoplasmático y la tasa GSSG/GSH en dicho orgánulo es de alrededor de 1. Estos investigadores atribuyeron la alta oxidación del glutatión a un importante transporte de glutatión oxidado del citosol al retículo endoplasmático. Parece que se necesita un estado altamente oxidativo para el correcto plegamiento de las proteínas.

El glutatión nuclear también merece atención. Las características estructurales de la membrana nuclear, particularmente sus complejos de poros que permiten la difusión de pequeñas proteínas, hacen difícil obtener una tasa GSH/GSSG razonable. Los estudios usando técnicas de fraccionamiento lipídico con microscopía confocal, sugieren que la concentración nuclear de GSH es similar a la del citoplasma (Voehringer y cols., 1998). Por otra parte, se ha descrito, utilizando fluorocromos específicos, que las concentraciones de glutatión en el núcleo son mayores que en el citoplasma en hepatocitos aislados (Bellomo y cols., 1992). Estos autores concluyen que debe existir un transporte de glutatión que lo traslade del citoplasma al núcleo. Además, el pool nuclear de glutatión es más resistente a la depleción que el citosólico, de manera que es muy probable que el tripéptido cumpla una función esencial en la fisiología del núcleo. De hecho, el glutatión se relaciona con la regulación de la organización de la matriz nuclear, con la regulación de la estructura de la cromatina (De Capoa y cols., 1982) y con la síntesis de DNA. Más recientemente, varios estudios han subrayado la importancia del estrés oxidativo en la regulación de los factores de transcripción como el NF- κ B y AP-1 (Droge, 2002).

5.2.1.8. Funciones fisiológicas del GSH.

El GSH participa en gran cantidad de procesos fisiológicos, la gran mayoría de ellos directamente relacionados con la estructura del mismo. Sus funciones son:

1. Papel en la síntesis del DNA: en este proceso se requiere la reducción de ribonucleótidos para formar desoxirribonucleótidos, reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa. Debe intervenir un donante de hidrógeno que puede ser la tioredoxina, o la glutarredoxina (Holmgren, 1979) dependiente de GSH.
2. Papel protector frente al estrés oxidativo. Dado que el GSH es uno de los antioxidantes principales de la célula, constituye una importante barrera de protección frente al estrés oxidativo (Sies, 1986). El GSH protege a la membrana celular contra el daño oxidativo ya que mantiene el estatus tiólico de la misma (Kosower y Kosower, 1983). El GSH puede excretarse también de las células y actuar como mecanismo de emergencia frente al daño que un exceso de GSSG puede causar, puesto que el GSSG reacciona con los grupos tioles de proteínas formando disulfuros mixtos (Ishikawa y cols., 1989). Detoxifica peróxidos por la glutatión peroxidasa.

3. Papel en la regulación de la síntesis de proteínas. Cuando el GSH se oxida los procesos de iniciación y elongación de la traducción se inhiben (Ochoa, 1983). Cuando el GSSG se reduce la elongación se reanuda y parece que es un aumento en la concentración de GSSG lo que hace que la síntesis proteica se inhiba. Mantiene también la correcta estructura tridimensional de muchas proteínas que en ocasiones están s-glutationiladas.
4. Colabora en la detoxificación de xenobióticos catalizada por glutatión s-transferasas (Orrenius y Moldeus, 1984).
5. Contribuye a la captación de aminoácidos en algunos tejidos (Viña y cols., 1989a).
6. Constituye un reservorio de cisteína en forma de pequeños tioles en grandes cantidades (Tateishi y cols., 1974b).
7. Modula actividades enzimáticas, por glutationilación o por regulación del estatus redox (Pajares y cols., 1992a; Pajares y cols., 1992b), y es coenzima de un sistema enzimático cuya función es poco conocida, el sistema de la glioxalasa.
8. Juega un papel en la homeostasis del calcio (Bellomo y cols., 1982)
9. Participa en la regulación de la proliferación celular (Terrádez y cols., 1993).

5.2.1.9. Papel antioxidante del glutatión: ciclo redox.

El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática alguna, o bien puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutatión peroxidasa.

Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio del enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (figura 13). Tanto la glutatión peroxidasa como la glutatión reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria (Orrenius y Moldeus, 1984).

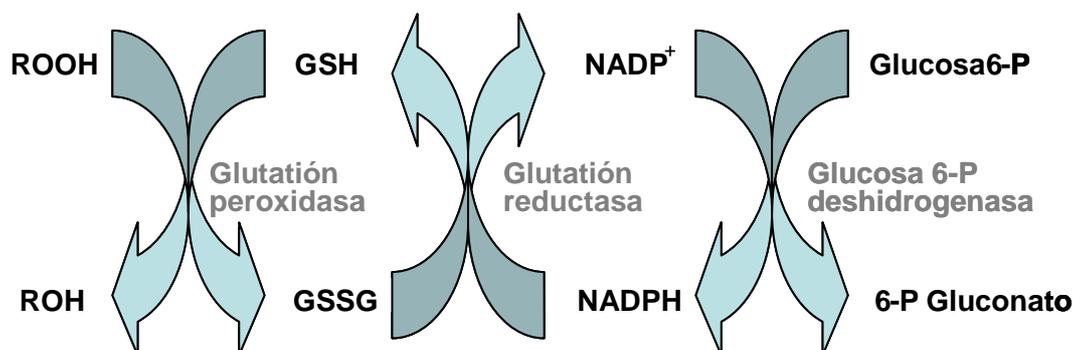
Como ya se ha indicado, los niveles de glutatión en la célula son muy altos, sin embargo, los niveles de la forma oxidada GSSG son significativamente más bajos. Asumiendo en equilibrio la glutatión reductasa y conociendo la relación

NADP/NADPH, la relación GSH/GSSG debería ser cercana al valor de 10,000 (Viña y cols., 1978). A pesar del cuidado experimental, en el laboratorio se encuentran relaciones entre el 10 y el 100, por lo que se puede suponer que la glutatión reductasa no está en equilibrio *in vivo* (Viña y cols., 1978). Por tanto, un cambio de glutatión reducido por oxidación de un 5% puede suponer un incremento de GSSG de más del 100% lo que implica que experimentalmente se ha de utilizar un método de medida que conlleve una oxidación del GSH mínima para medir con precisión el GSSG (Asensi y cols., 1994).

En condiciones fisiológicas hay dos sistemas clave para mantener los aminoácidos de cisteína reducidos de las proteínas, el sistema glutarredoxina y el sistema tiorredoxina. El sistema glutarredoxina transfiere equivalentes de reducción del NADPH a los grupos tiol de ciertas enzimas vía GSH (Holmgren, 1990).

La tiorredoxina es una molécula formada por dos tioles que actúa como donador de hidrógeno para enzimas con sulfato reducido y sulfóxidos de metionina y para una proteína bisulfato reductasa (Holmgren, 1984). La tiorredoxina oxidada, que contiene un *disulphide*, es primero reducida por NADPH y por la tiorredoxín reductasa (Holmgren, 1984).

Figura 13.- Ciclo redox del glutatión.



5.2.1.10. Glutatión y pancreatitis.

El glutatión juega un papel importante en la defensa de las células acinares (Luthen y cols., 1998). Se ha descrito la depleción de glutatión y el incremento de la peroxidación lipídica en el tejido pancreático durante la fase inicial de la pancreatitis aguda (Schöenberg y cols., 1992; Sweiry y Mann, 1996). El tratamiento con glutatión monoetil éster aumenta los niveles de glutatión en páncreas y disminuyó el daño pancreático inducido por ceruleína en ratones

(Neuschwander-Tetri y cols., 1992). El pretratamiento con N-acetilcisteína, uno de los precursores del glutatión, disminuye la severidad de la pancreatitis en ratones al disminuir los niveles de dienos conjugados e IL-6. Además, disminuye la severidad del daño pulmonar y la mortalidad (Demols y cols., 2000). Por otra parte, la inhibición de la síntesis de glutatión con L-butionina-(S,R)-sulfoximida causa más necrosis en el páncreas y reduce la supervivencia de las ratas con pancreatitis (Alsfasser y cols., 2002). Conviene resaltar que los ratones *knockout* de NF- κ B presentan niveles de glutatión elevados y alteraciones histológicas reducidas, sugiriendo una interacción entre NF- κ B y el glutatión en el páncreas (Altavilla y cols., 2003). Queda pendiente aclarar si la peroxidación lipídica y la depleción de glutatión son causa o consecuencia de la pancreatitis, aunque parece que ambos procesos no son capaces de iniciar la pancreatitis aguda (Rau y cols., 2000).

Nuestro grupo ha observado depleción de glutatión pero no oxidación del mismo, y este efecto ocurre inicialmente en el páncreas en el transcurso de la pancreatitis aguda (Gomez-Cambronero y cols., 2000). Por lo tanto, la detoxificación de especies reactivas de oxígeno asociadas con el proceso inflamatorio no parece ser la mayor causa de la depleción de glutatión tan temprana. Por tanto, la depleción de glutatión podría suceder en parte por la activación de proenzimas ya que se conoce que las proteasas activadas como la carboxipeptidasa pueden cortar el glutatión (Meister, 1991). De hecho, la activación de tripsinógeno se acompaña de depleción de glutatión en la pancreatitis aguda experimental (Luthen y cols., 1998).

El glutatión juega un papel en el acoplamiento del estímulo de secreción acinar (Stenson y cols., 1983), en el mantenimiento del citoesqueleto (Jewell y cols., 1982) y en el plegado correcto de las proteínas en el retículo endoplasmático (Scheele y Jacoby, 1982). Así, la depleción del glutatión intracelular puede contribuir al erróneo transporte de gránulos de zimógeno (bloqueo secretor) y a la activación prematura de proenzimas pancreáticos (Luthen y cols., 1995a; Yu y cols., 2002).

El daño mitocondrial está íntimamente asociado con la severidad de la depleción de glutatión (Meister, 1991). La mitocondria no puede sintetizar glutatión puesto que carece de actividad γ -glutamil cisteína sintetasa o de actividad glutatión sintetasa (Meister, 1991), y por tanto obtiene el glutatión por transporte del citosol. Una marcada depleción de glutatión mitocondrial produce daño mitocondrial, que se previene completamente con la administración de glutatión monoésteres (Meister, 1991). La depleción del glutatión pancreático puede ser responsable del daño mitocondrial asociado a la pancreatitis aguda. De hecho, nuestro grupo ha encontrado que la restauración parcial de los niveles

intracelulares de glutatión tras el tratamiento con pentoxifilina previno el daño a la mitocondria pancreática (Gomez-Cambronero y cols., 2000).

5.2.2. Otros antioxidantes no enzimáticos.

La vitamina C o ácido ascórbico, es una molécula hidrosoluble y se la considera una de las más poderosas y quizá la menos tóxica de entre los antioxidantes naturales (Bendich y cols., 1986). Se encuentra en concentraciones elevadas en muchos tejidos, el plasma contiene alrededor de 60 $\mu\text{mol/L}$. Los humanos, otros primates superiores y los cobayas no poseen uno de los enzimas imprescindibles para su síntesis, teniendo que incorporarla con la dieta.

Es capaz de ceder dos electrones transformándose en dihidroascorbato que será reciclado a ácido ascórbico por el enzima dihidroascorbato reductasa. Por ello, el dihidroascorbato se encuentra en concentraciones mucho más bajas que el ascorbato. Reacciona con numerosas especies reactivas, como son el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. En solución acuosa también puede reaccionar con especies de nitrógeno reactivas, previniendo la nitración de moléculas diana. Por otro lado es capaz de regenerar la forma oxidada de la vitamina E. Existen transhidrogenasas, como la glutarredoxina, capaces de reducir el ácido dihidroascórbico con el consumo de glutatión reducido, con lo que el glutatión mantiene unos niveles altos de vitamina C y ésta actúa como ahorradora de glutatión (Meister, 1994).

Bajo el nombre de Vitamina E se engloba una familia de compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles de las que los tocoferoles es el más activo y abundante. En el organismo existen 4 tipos principales de tocoferoles: alfa, beta, gamma y delta tocoferol. Estos grupos de compuestos altamente lipofílicos, tienden a concentrarse en las membranas biológicas y en lipoproteínas plasmáticas, actuando probablemente como el antioxidante más potente del organismo, en cuanto a su capacidad como bloqueador de la cadena de lipoperoxidación.

El ácido lipoico es un tiol endógeno que sirve como cofactor de los complejos α -deshidrogenasa. Normalmente el ácido lipoico está presente en pequeñas cantidades (5-25 nmol/g) en los tejidos animales. Tras la suplementación dietética éste se reduce a ácido dihidrolipoico (DHHLA) al que se le reconoce su papel en la regeneración de antioxidantes fisiológicos tales como la vitamina E, el ascorbato y el GSH (Packer y cols., 1995).

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en el ser humano y otros primates, ya que carecen de la enzima uricasa, la cual hace que continúe la degradación hasta alantoína y urea. El ácido úrico no parece ser simplemente un producto de desecho de una vía metabólica, de hecho, se ha correlacionado positivamente su concentración en el plasma de distintas especies con la esperanza de vida (Cutler, 1984).

Se ha demostrado *in vivo* como un agente antioxidante ubicuo, aunque en algunos casos sólo en presencia de otros antioxidantes, habiéndose demostrado su interacción con la vitamina C (Aruoma y Halliwell, 1989). Neutraliza radicales hidroxilo, oxígeno singlete, oxidantes oxohemoglobínicos, radicales hidroperóxilos y ácido hipocloroso (Becker, 1993), y además el ácido úrico es capaz de formar complejos estables en proporción 2:1 con iones férricos, actuando como protector contra las oxidaciones catalizadas por el hierro (Davies y cols., 1986).

Los carotenoides, colorantes que se aíslan principalmente de las plantas, poseen pronunciada actividad antioxidante. Otros compuestos de interés son los flavonoides que son una familia muy extensa de antioxidantes polifenólicos. Son muchas las propiedades que se les atribuyen aunque desafortunadamente tienen una biodisponibilidad muy pobre.

La N-acetilcisteína (NAC), aunque no es un antioxidante propiamente dicho, genera cisteína que participa en la síntesis de glutatión (Prescott y cols., 1977) que, como hemos comentado anteriormente, tiene como principal función la protección de los tejidos frente al daño oxidativo (Kosower y Kosower, 1978).

Por último cabe destacar el alopurinol y su derivado metabólico oxipurinol, que se comportan como antioxidantes puesto que inhiben la xantina oxidasa. Su mecanismo y características se han comentado en la regulación de la actividad de la xantina óxidorreductasa.

5.3. Implicación del estrés oxidativo en la fisiopatología de la pancreatitis aguda.

La búsqueda de un agente desencadenante de la pancreatitis aguda y las semejanzas con otros tipos de lesiones donde el estrés oxidativo tiene un papel importante, estimuló la investigación de la participación de los radicales libres en la pancreatitis aguda. A principios de los años ochenta, Hillary Sanfey y sus colaboradores pudieron demostrar que el pretratamiento con agentes antioxidantes disminuía de forma significativa la hiperamilasemia, el edema y el

incremento de peso del páncreas. Utilizando tres modelos diferentes de pancreatitis experimental en el perro comprobaron cómo la administración tanto de superóxido dismutasa y de catalasa (Sanfey y cols., 1984), como la administración de alopurinol (Sanfey y cols., 1985), tenía un efecto beneficioso respecto al grupo de animales control. Posteriormente se ha puesto de manifiesto que en el curso de la pancreatitis aguda experimental existe una pérdida del equilibrio entre los sistemas defensivos representados por la superóxido dismutasa y los ofensivos representados por la xantina oxidasa a favor de estos últimos, con aumento de parámetros indicadores de estrés oxidativo que se pueden prevenir administrando los antioxidantes enzimáticos (Poch y cols., 1999).

Durante años se ha estudiado la pancreatitis aguda buscando la razón por la que una pancreatitis aguda se desencadena, y la razón por la que una pancreatitis pasa de leve a grave. El estrés oxidativo se presentaba como candidato después del fracaso de otros agentes para explicar estas dos cuestiones. Los experimentos preliminares mostraron que se trata de un proceso precoz y sugieren que la xantina oxidasa es una de las principales fuentes de radicales libres, de hecho, la tripsina es capaz *in vitro* de convertir por proteólisis la XDH en XO (Sanfey y cols., 1985). Las propiedades quimioattractivas de los radicales libres hacen que tras la liberación de éstas se produzca un infiltrado de neutrófilos en el páncreas, que a su vez producen más radicales libres, con lo que se amplifica la respuesta inflamatoria. Los radicales generados por los neutrófilos podrían participar incluso en la transformación del tripsinógeno en tripsina, por oxidación de proteínas vía NADPH oxidasa, con lo que se cerraría un círculo que conduciría a la destrucción de la glándula pancreática (Gukovskaya y cols., 2002b).

La fuente de producción de los radicales libres varía en función del modelo estudiado. Comparando el modelo experimental de pancreatitis aguda leve, inducido por sobreestimulación con ceruleína, con el modelo de pancreatitis grave inducido por perfusión de taurocolato, se ha podido determinar que el aumento de las ERO en el primer caso es debido principalmente a la infiltración por neutrófilos activados mientras que en el segundo caso se debe sobre todo a la conversión de XDH a XO (Closa y cols., 1994). En cualquiera de los modelos se pueden detectar radicales libres y estrés oxidativo en fases precoces, pero el momento de aparición es controvertido. Así, el grupo de Telek y colaboradores, mediante una técnica histoquímica basada en el cerio, demostró en la pancreatitis aguda la presencia precoz de estrés oxidativo *in situ* en páncreas debido primeramente a las células acinares (posiblemente por la xantina oxidasa), y posteriormente debido a los polimorfonucleados (Telek y cols., 1999).

Tanto en modelos de PA leve, inducida por ceruleína o L-arginina, como en modelos de PA grave, inducida por taurocolato, se ha podido demostrar un

descenso precoz de GSH e incluso de cisteína, su aminoácido precursor, que se mantiene y precede a la formación de edema pancreático. Este descenso en los niveles de glutatión supondría, además de la pérdida de la capacidad de defensa antioxidante, una alteración en la integridad del citoesqueleto y en la membrana de las organelas intracelulares, lo que permitiría la prematura activación de las enzimas digestivas en el interior de las células acinares y el consiguiente desarrollo del proceso inflamatorio (Schulz y cols., 1999). Este mecanismo puede ser revertido, disminuyendo el grado de afectación pancreática, cuando los animales de experimentación son pretratados con precursores del GSH como la cisteína o el zinc o son tratados con pentoxifilina. Sin embargo, en un ensayo clínico en 79 pacientes con PA tratados con una combinación de S-adenosilmetionina y N-acetilcisteína no se consiguieron reproducir estos beneficiosos efectos (Sharer y cols., 1995).

Todos estos hallazgos de estrés oxidativo en la pancreatitis aguda promovieron una serie de experimentos para intentar demostrar su papel como iniciador de la enfermedad. La depleción de glutatión "per se" no se vio capaz de producir una pancreatitis aguda ya que no aparece en modelos de depleción prolongada de glutatión (Martensson y cols., 1990) ni al disminuir el glutatión pancreático (Luthen y cols., 1994). Rau y colaboradores intentaron provocar una pancreatitis aguda profundiendo xantina oxidasa de forma local y sistémica sin encontrar los signos típicos de pancreatitis (Rau y cols., 2000). Por tanto, se considera el estrés oxidativo como un agente amplificador y no iniciador del desarrollo de la pancreatitis aguda.

En los efectos sistémicos de la enfermedad se ha demostrado la implicación del estrés oxidativo. En el modelo de PA grave por perfusión de taurocolato se ha demostrado la presencia de un incremento en la actividad XO plasmática y un descenso en los niveles de GSH, que no tiene excesiva repercusión a su paso por el hígado (donde no se produce un aumento en productos de peroxidación lipídica), pero que se acompaña de un importante infiltrado inflamatorio a nivel pulmonar (Folch y cols., 1998). Esta generación de ERO parece ser también esencial para la activación de los neutrófilos y su interacción con la célula endotelial, en las cuatro fases conocidas como rolling o disminución de la velocidad y la forma de rodamiento, activación, adhesión firme y migración. Esta interacción está controlada por receptores de la superficie de los neutrófilos y sus correspondientes ligandos en las células endoteliales como las integrinas y las selectinas. Los radicales superóxido producidos por la XO circulante tras ser convertidos en peróxido de hidrógeno, parecen estimular la sobreexpresión de los genes encargados de la síntesis de la ICAM-1 y de la P-selectina mediante la enzima poli (ADP-ribosa) sintetasa (PARS), lo que favorecería la infiltración y activación de los neutrófilos en el pulmón. Del mismo

modo que en modelos con depleción o inactivación de neutrófilos, el tratamiento con SOD y catalasa o con inhibidores de la PARS logra disminuir la producción de MPO y el daño pulmonar por medio de dicho mecanismo (Folch y cols., 2000b).

A nivel clínico se ha podido determinar, mediante quimioluminescencia, la presencia de estrés oxidativo en sangre periférica, un descenso en los niveles de vitamina C y vitamina E, así como un aumento en los niveles de tiobarbituratos en pacientes con PA respecto a sujetos sanos. Estos cambios son directamente proporcionales a la severidad de la pancreatitis aguda, más intensos en las formas graves que en las leves, y además se mantienen en el tiempo más allá de las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Tsai y cols., 1998). En muestras de tejido pancreático procedente de pacientes intervenidos por complicaciones de PA grave se ha obtenido, mediante técnicas combinadas de histoquímica y microscopía de láser confocal, un aumento en la producción de ROS, cuya fuente principal parece ser la XO de las células acinares (Telek y cols., 2001).

En definitiva, los radicales libres parecen actuar en la pancreatitis aguda de manera similar a cualquier otro proceso inflamatorio, es decir, amplificando la lesión y manteniendo el proceso inflamatorio. El bloqueo de los radicales libres con diferentes agentes terapéuticos parece tener un efecto protector sobre la enfermedad y sus complicaciones sistémicas, especialmente a nivel pulmonar, lo que sugiere un mecanismo patogénico similar en todos los modelos de pancreatitis aguda experimental estudiados. Las discordancias en los resultados entre los ensayos experimentales y los clínicos hacen que el papel del estrés oxidativo en la fisiopatología de la PA y sus complicaciones sistémicas sea un campo en continua investigación.

6. PROTEIN-QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAP QUINASAS)

6.1. Introducción.

Para poder sobrevivir, la célula necesita una regulación de sus genes de manera correcta. Las vías de transducción de la señalización intracelular son de enorme importancia para la adecuada regulación génica. En células eucariotas, la fosforilación de factores proteicos intracelulares seguida de transcripción génica específica, es un mecanismo universal de funcionamiento de estas señales de transducción. Además, los elementos más importantes de esta señalización son comunes tanto en humanos como en plantas o en hongos.

En mamíferos, estos antiguos circuitos de regulación mantienen el equilibrio necesario entre crecimiento, diferenciación y muerte celular. Dada su enorme importancia, el conocimiento de las autopistas de la información que van desde la superficie celular hasta el núcleo se han desarrollado de manera espectacular en los últimos años. Una de las vías más estudiadas es la de las proteín-quinatas activadas por mitógenos, también llamadas MAP quinatas (*mitogen-activated protein kinases*), las cuales juegan un papel crucial en muchos aspectos de la respuesta inmune inflamatoria (Dong y cols., 2002).

La alteración de la expresión génica es la base de la patogenia de multitud de enfermedades inflamatorias tales como la pancreatitis, la artritis reumatoide, la hepatitis, la psoriasis y la enfermedad inflamatoria intestinal (Hommes y cols., 2002). Estos mecanismos son fundamentales en el inicio de la respuesta inflamatoria y los productos formados por la inducción de genes inflamatorios, entre los que se incluyen citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, actúan como reclutadores de células inmunocompetentes de la circulación al foco afectado provocando un mayor daño inflamatorio.

Por ello, se está desarrollando una investigación exhaustiva de estas vías de señalización, obteniéndose hasta el momento importantes resultados en los ensayos clínicos utilizando inhibidores de las MAP quinatas.

6.2. Señales de transducción y control de la expresión génica.

6.2.1. Rutas de señalización intracelular.

Hay dos mecanismos principales que pueden actuar para transmitir las señales extracelulares hasta producir cambios en la expresión de genes específicos. Por un lado, existen numerosas cascadas de fosforilación que se autopropagan y que activan factores de transcripción residentes en el núcleo. Por otro lado, también se encuentran un número de factores de transcripción citoplasmáticos latentes que son activados tras la interacción de un ligando a un receptor de la superficie de la membrana. Después de la activación, estos factores migran al núcleo en donde se acumulan para modular la expresión de los genes. Recientemente se ha propuesto un sistema de clasificación de los factores de transcripción que regulan el desarrollo y la especialización celular y cuyo número continúa incrementándose (Brivanlou y Darnell, 2002).

Dentro del primer grupo, el de las proteínas que actúan en cascada por fosforilación, se encuentran las MAP quinasas las cuales constituyen la principal ruta de señalización inflamatoria desde la superficie celular hasta el núcleo (Dong y cols., 2002). Otras cascadas de fosforilación serían las que se activan tras incrementos de segundos mensajeros intracelulares (incluyendo cAMP y Ca^{2+}), las proteínas relacionadas con el receptor de membrana G y las quinasas del receptor de tirosina (Hunter, 2000). Normalmente, estas vías de transducción fosforilan factores de transcripción nucleares activándolos y generando alteraciones en la transcripción génica.

En el segundo grupo se han identificado 8 principales vías de activación de factores de transcripción citoplasmáticos. Entre ellas hay dos vías que se activan directamente por receptores de superficie, las denominadas familias de las moléculas SMAD, que se relacionan con la transducción de la superfamilia de ligandos del factor de transformación del crecimiento beta (TGF- β) (Massague, 2000) y la familia de las moléculas STAT (señales de transducción y de activadores de la transcripción). Estas vías son activadas por más de 20 citoquinas que comparten receptores asociados con la quinasa Janus (JAK) y que fosforilan los receptores respectivos en residuos de tirosina para iniciar la señal de transducción (Darnell, 1997). Podemos resumir sus mecanismos de acción diciendo que las enzimas inactivas de JAK se unen ligeramente a los dominios específicos de receptores de citoquinas como los receptores de interferón $\alpha/\beta/\gamma$, o las interleuquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 o IL12. Tras la unión al ligando, el receptor asociado a JAKs se vuelve activo por fosforilación y fosforila residuos de tirosina en las porciones citoplasmáticas de los receptores agrupados.

Consecuentemente, las proteínas STAT reconocen estos restos de fosfotirosinas y son fosforiladas tras la unión a los receptores por JAKs asociadas a receptor. Tras la unión de dos proteínas de STAT, se disocian del receptor y migran al núcleo donde se unen al ADN en secuencias específicas del promotor de los genes responsables de citoquinas y activan su transcripción. La activación de STAT tiene importantes consecuencias celulares como por ejemplo en la diferenciación de las células T helper, en concreto, la activación de STAT4 es suficiente para conferir a la célula fenotipo T helper 1 mientras que la activación de STAT6 causa transición de una célula precursora a una célula T helper 2.

Respecto a las otras cuatro vías importantes que pueden activar factores de transcripción éstas requieren la fosforilación citoplasmática de serina y/o proteólisis. En este grupo se incluye la familia del factor rel/nuclear kappa B, que es activada en respuesta a multitud de estímulos extracelulares como el de TNF- α o IL-1 y de productos virales y bacterianos (Perkins, 2000). Este grupo también incluye la vía Wnt y la vía Notch. La vía Wnt de señalización es fundamental en el desarrollo normal y maligno de las células. La vía de Notch se ha visto implicada en la linfopoyesis y algunos datos recientes sugieren que ésta juega un papel crucial en la diferenciación de las células T de un progenitor común (Allman y cols., 2002). Además, parece también importante en el desarrollo del sistema nervioso ya que determina el destino del primer segregado de precursores neuronales hasta alcanzar el grado de diferenciación de células como la neurona y la glía (Justice y Jan, 2002).

Finalmente, fluctuaciones en segundos mensajeros (como el Ca²⁺ o las concentraciones de fosfoinositol) pueden activar factores de transcripción citoplasmáticos latentes como por ejemplo, el factor nuclear de células T activadas (NFAT) (Crabtree y Olson, 2002) y Tubby, un producto de un gen que está asociado a la obesidad (Ikeda y cols., 2002).

6.2.2. Control de la expresión génica.

Existen numerosos factores que contribuyen para conseguir una delicada regulación de la expresión génica en respuesta a diversos estímulos celulares. Entre ellos, los factores de transcripción activados por rutas de señalización intracelular juegan un papel fundamental en esta regulación. Mediante combinaciones de un número relativamente bajo de factores transcripcionales, se consigue una enorme especificidad en las dianas génicas que responden a condiciones fisiológicas y patológicas muy variadas. La estructura de la cromatina ejerce en general una acción de represión de la expresión génica, ya que la presencia de nucleosomas puede dificultar la interacción de los factores de transcripción con el DNA. Durante la evolución, las células eucariotas han perfeccionado mecanismos coordinados de acción directa sobre la estructura

nucleosomal que permiten modular este carácter represor de la cromatina. Entre estos mecanismos caben destacar las modificaciones covalentes post-traduccionales de histonas (Zhang y Reinberg, 2001), la remodelación de la cromatina (Becker y Horz, 2002), la metilación del DNA (Keshet y cols., 1986), ensamblaje de las variantes de las histonas y expresión de RNA no codificantes (Keshet y cols., 1986).

Por la importancia que tienen en procesos inflamatorios y en el estrés oxidativo, se han estudiado en la presente tesis los siguientes factores de transcripción:

6.2.2.1. Factor Nuclear *kappa* B (NF- κ B).

El NF- κ B es un factor de transcripción que se activa por numerosos estímulos extracelulares tales como citoquinas proinflamatorias, estrés oxidativo o agentes patógenos (Baldwin, 1996). El factor es un dímero que se encuentra unido al inhibidor de NF- κ B (I κ B) en el citosol. Cuando I κ B se fosforila, se libera NF- κ B permitiendo su traslocación al núcleo en donde interacciona con genes diana específicos. El I κ B fosforilado puede ser posteriormente ubiquitinilado, siendo esta modificación una señal para la degradación por el proteasoma 26S (Chen y cols., 1995). Las rutas de activación de NF- κ B convergen sobre la I κ B-quinasa (IKK), que inicia el proceso activador al fosforilar a I κ B.

En la pancreatitis aguda experimental se ha observado una activación bifásica de NF- κ B; una activación temprana, que parece producida por el tripsinógeno, y una activación tardía que parece producida por las células inflamatorias que se infiltran en el páncreas (Gukovsky y cols., 1998).

6.2.2.2. Proteína estimuladora 1 (SP-1).

El factor de transcripción SP-1 fue el primero de una familia de factores de transcripción que poseen dedos de zinc. Este factor juega un papel importante en gran número de procesos fisiológicos, como la regulación del ciclo celular, la activación hormonal, la apoptosis y la angiogénesis. La oxidación de residuos de cisteína en los dedos de zinc puede modificar su capacidad de unión al DNA y alterar su funcionalidad. Por tanto, SP-1 es un factor de transcripción sensible al estrés oxidativo (Webster y cols., 2001).

6.2.2.3. c-Myc.

Este factor transcripcional es una fosfoproteína producto del proto-oncogen *c-myc*. Participa en la regulación de la transcripción génica en células normales y neoplásicas. Su activación está mediada a través de la dimerización con Max, uniéndose de ese modo a la secuencia consenso CA(C/T)GTG (la denominada

caja E). Aunque la proliferación celular es posible sin su presencia, c-Myc actúa como integrador y acelerador de la proliferación y del metabolismo celular (Boxer y Dang, 2001).

6.2.2.4. c-Jun.

El factor c-Jun define una familia multigénica de factores de transcripción inducibles que se encuentran usualmente en forma de dímeros. Es común que formen dímeros entre ellos o con miembros de la familia de c-Fos. El factor c-Jun tiene una vida media muy baja, en el orden de 1 h, y su degradación está muy bien regulada. Las MAP quinasas, en concreto JNK y ERK 1/2, tienen capacidad de fosforilar a c-Jun modulando su activación. Se sabe además que es capaz de regular genes que están vinculados con la apoptosis y la supervivencia celular.

6.3. MAP quinasas.

Las MAP quinasas son las más antiguas y mejor conservadas vías de señalización en eucariotas y son cruciales en la respuesta inmune. Comprenden una familia de enzimas que forman una red integrada para llevar a cabo funciones celulares de control de diferenciación, proliferación y muerte celular (Kyriakis y Avruch, 2001). Estas proteínas citoplasmáticas pueden modular las actividades de otras proteínas intracelulares por medio de la fosforilación a sus aminoácidos serina y treonina. Hasta el día de hoy, se han identificado más de 20 isoformas de MAP quinasas. La activación de las enzimas MAP quinasas por ellas mismas es inusual, puesto que requieren de la fosforilación simultánea de residuos de treonina y tirosina, y por tanto requieren de la actividad de quinasas específicas duales conocidas como MAP quinasas quinasas (MAPKK o MEK). El potencial fosforilador de las demás familias de quinasas de mamífero se restringe, bien a fosforilar residuos de serina/treonina, o a fosforilar residuos de tirosina (Hommes y cols., 2003).

La especificidad de la fosforilación que realizan las MAP quinasas quinasas es dependiente del motivo de la proteína que fosforilan. Todas ellas fosforilan residuos Thr-**X**xx-Tyr, pero el aminoácido que se encuentra en la posición **X** es el que confiere la especificidad, de forma que, según sea un aminoácido o sea otro, será susceptible de ser sustrato de determinada MAP quinasa quinasa o no (Schramek, 2002). Por tanto, la activación de las MAP quinasas quinasas tendrán implicaciones específicas al reconocer y fosforilar motivos específicos.

Por otro lado, las MAP quinasas quinasas para ser activas han de ser fosforiladas también por otras enzimas que controlan su actividad, y que se denominan MAP quinasas quinasas quinasas (MAPKKK o MEKK), una familia de

proteínas entre las que se encuentra el protooncogen *c-raf* como miembro más prominente. El control de ésta familia de enzimas y su especificidad de sustrato es en la actualidad tan solo parcialmente conocido (Hommes y cols., 2003).

Cuando las MAP quinasas se activan, los factores transcripcionales presentes en el citoplasma o en el núcleo son fosforilados y activados, produciendo la expresión de ciertos genes diana y provocando una respuesta celular. Las interacciones múltiples entre las diferentes cascadas de MAP quinasas sirven para integrar y moderar respuestas celulares. De hecho, se ha demostrado que las MAP quinasas comparten especificidad de sustratos y fosforilación de sitios de regulación con múltiples proteínas quinasas (Fukunaga y Hunter, 1997; Waskiewicz y cols., 1997; Lewis y cols., 1998).

Se distinguen tres grandes grupos de cascadas reguladoras de MAP quinasas en humanos que en último término conducen a modificar la expresión génica. Estas tres familias de quinasas son la familia de ERK 1/2, la de JNK y la de p38.

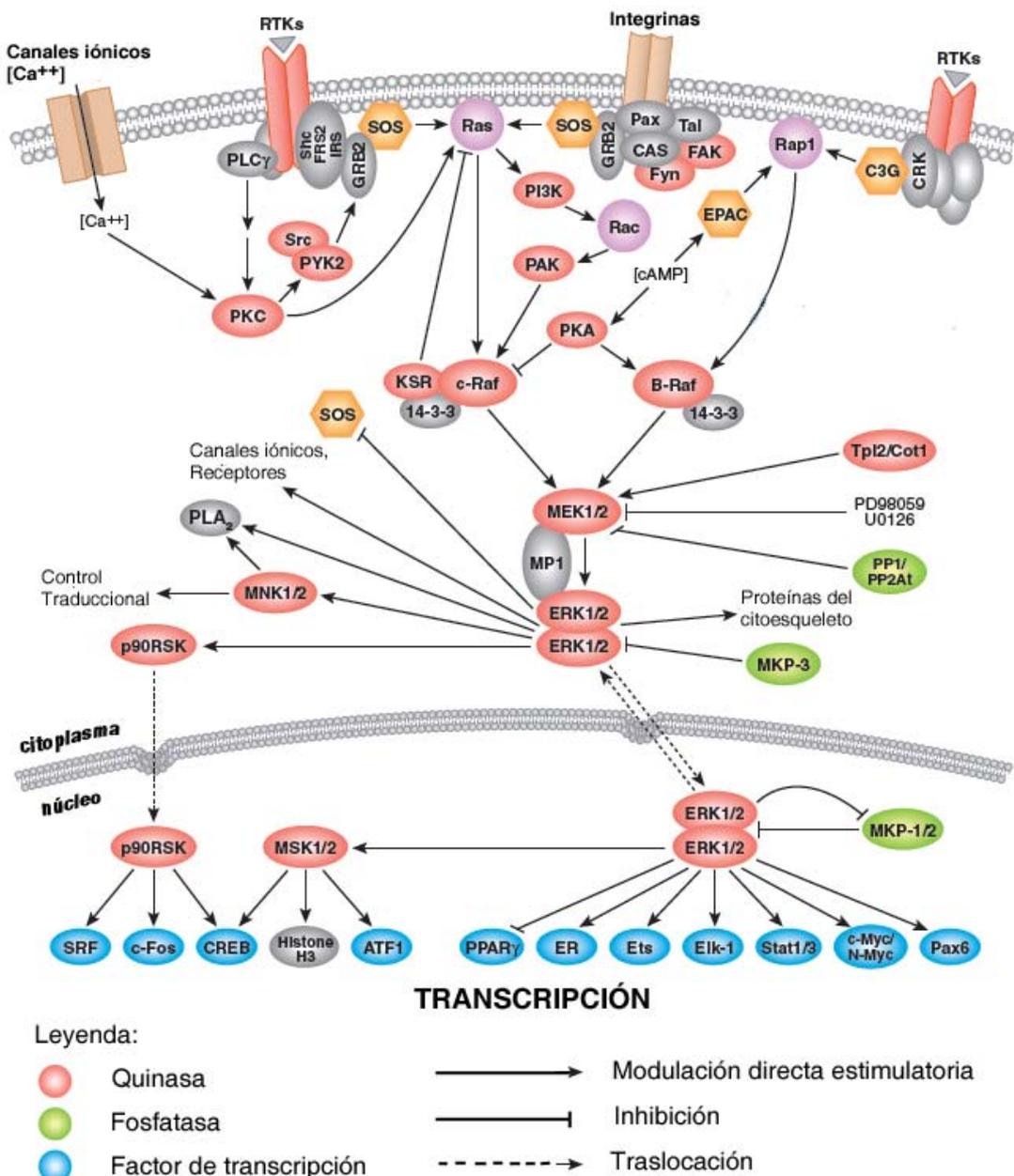
6.3.1. ERK 1/2.

La familia de ERK 1/2 (quinasas reguladas por señales extracelulares), la primera en ser caracterizada, es mediadora vital de un número importante de transformaciones celulares que incluyen el crecimiento, la proliferación y la supervivencia. Hay dos isoformas de ERK que se expresan ubicuamente, denominadas ERK 1 y ERK 2. En ocasiones se las denomina MAP quinasas p42/p44 debido a su tamaño molecular (Boulton y cols., 1990; Boulton y cols., 1991). En esta cascada, MEK 1 y MEK 2 son las enzimas que fosforilan en un nivel superior a ERK 1 y ERK 2, actuando como MAPKK, y la proteína RAF actúa como MAPKKK (figura 14). La duración de la activación de ERK 1/2 depende de dos mecanismos: la eliminación de uno o de los dos grupos fosfato que se encuentran en los residuos tirosina o serina/treonina y la acción de fosfatasa, que dependen asimismo de la localización intracelular, puesto que ERK no solo fosforila en el núcleo si no también en la membrana (v.g. fosfolipasa A) y en el citoplasma (Todd y cols., 1999). Experimentos con ratones *knockout* han puesto en evidencia la importancia de esta familia de MAP quinasas (Pearson y cols., 2001). La alteración de una de las tres proteínas Raf resulta fatal para los ratones, y si la diana es MEK 1, se observa muerte embrionaria con signos de necrosis tisular. El papel que desempeña ERK 1/2 es, por el contrario, bastante desconocido hasta la fecha pero se sabe que regula la activación de la familia de la proteína activadora 1 (AP-1). Miembros de esta familia, fosforilados por ERK 1/2, incluyen a c-Jun, c-Fos, y el factor de activación de la transcripción 2 (ATF-2), pero la relevancia *in vivo* de esta fosforilación no está clara aún (Gupta y cols.,

1995). ELK-1, que activa c-Fos, es otra proteína de las proteínas fosforiladas por ERK 1/2.

Aunque primeramente se pensó que el papel de ERK 1/2 se restringía al crecimiento celular y a la proliferación, en la actualidad parece claro que muchos procesos inflamatorios están relacionados con la activación de ERK 1/2. Ratones deficientes en ERK 1 son normales y fértiles pero muestran una maduración deficitaria en timocitos y tienen reducida la expresión de las cadenas α y β del receptor celular T. Esto indica que la activación de ERK es crucial para la activación de células T y se ha descrito que se produce a través de la familia de AP-1.

Figura 14.- Vía de señalización de ERK.



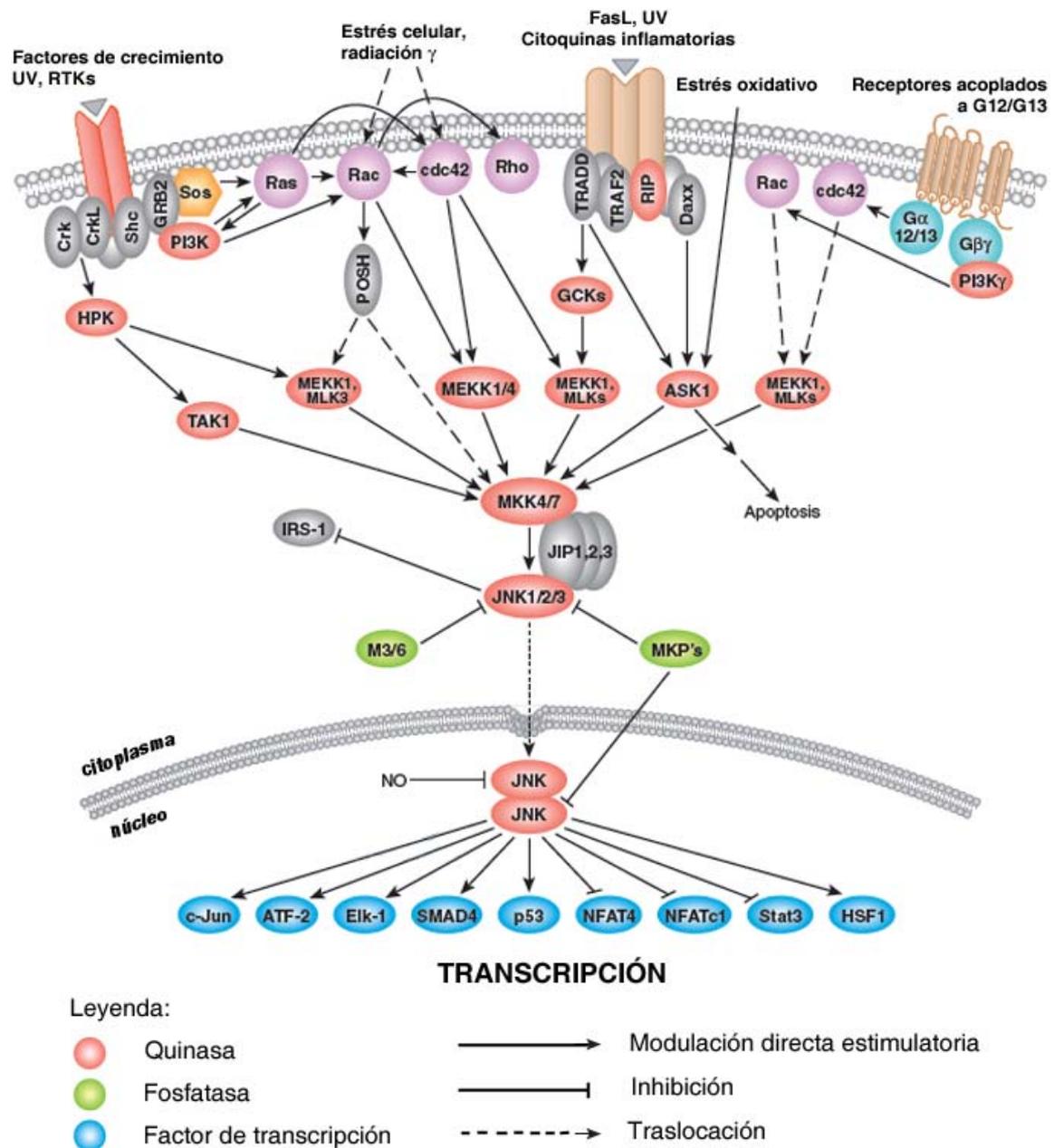
6.3.2. JNK.

La vía de señalización de JNK (quinasa del NH₂ terminal de c-Jun) es una vía activada por estrés que se relaciona con la proliferación celular y la apoptosis. Las quinasas JNK se codifican por tres genes, *jnk-1*, *jnk-2* y *jnk-3*, que son alternativamente enlazadas para formar las distintas isoformas de JNK (Gupta y cols., 1996). En paralelo con ERK 1/2, JNK parece ser fundamental en la activación de AP-1 producida por estrés y por la exposición de varias citoquinas (Ip y Davis, 1998).

Las dos proteínas MAPKK que activan JNK son MKK7, activada primariamente por citoquinas (TNF- α , IL-1), y MKK4, activada primariamente por el estrés en que se encuentre la célula (figura 15). El número de proteínas que actúan como MAPKKK es elevado, con más de 12 proteínas intracelulares, incluyendo aquellas del grupo MEKK 1-4. Sin embargo, no se conoce la relevancia de cada una de ellas tras cada estímulo fisiológico específico (Weston y Davis, 2002). La duración y amplitud de la activación de JNK representa el balance entre los estímulos externos y los mecanismos intracelulares de inactivación. Existen cuatro factores negativos de JNK que han sido identificados: la fosfatasa MAP quinasa 7, la proteína de shock térmico 72, la oncoproteína maligna, y el óxido nítrico (Weston y Davis, 2002). Los dos componentes primarios de transcripción que fosforila JNK de AP-1 son c-Jun y ATF-2.

Los tres genes de JNK han sido suprimidos en ratón dando como resultado defectos en la respuesta inmune y en la apoptosis. Los *knockout* en fibroblastos embriogénicos poseían defectos en la activación de AP-1, proliferación disminuida y resistencia a la apoptosis inducida por estrés (Tournier y cols., 2000). Si el gen suprimido es el que corresponde a MKK 7, los resultados obtenibles indican que la activación de TNF- α es vía MKK 7 pero niveles basales de MKK4 se requieren también para una activación completa por parte de TNF- α (Tournier y cols., 2001). Los estudios que se han centrado en JNK2 indican que parece tener un papel crucial en la diferenciación celular y la producción de citoquinas (Yang y cols., 1998a; Tournier y cols., 2001).

Figura 15.- Vía de señalización de JNK.



6.3.3. p38.

La vía de la MAP quinasa p38 comparte muchas similitudes con las otras cascadas de MAP quinasas, asociándose asimismo a la inflamación, el crecimiento y la muerte celular. Primeramente, se identificó la quinasas p38 en ratón en respuesta al lipopolisacárido bacteriano LPS (Han y cols., 1994). Hasta

la fecha se han identificado cuatro isoformas de MAP quinasas las cuales comparten un 60 % de homología. Dos isoformas se expresan de manera ubicua ($p38\alpha$ y $p38\beta$) (Ono y Han, 2000) mientras que $p38\gamma$ se expresa de manera predominante en músculo esquelético y $p38\delta$ se encuentra en los pulmones, los riñones, los testículos, el páncreas y el intestino delgado. En la mayoría de las células inflamatorias la forma alfa es la que predominantemente se encuentra activada.

La activación de p38 por parte de agentes extracelulares incluye a muchas citoquinas (IL-1, IL-2, IL-7, IL-17, IL-18, TGF- β y TNF- α) y un número de patógenos que activan p38 por medio de diferentes receptores *Toll*, incluyendo el LPS, el peptidoglicano, la enterotoxina B de estafilococo, el ecovirus 1 y el virus 1 del herpes simple (Ono y Han, 2000). Además, muchos factores de crecimiento, como eritropoyetina, factor estimulador de colonias de granulocitos, de macrófagos y factor de estimulación de colonias 1 (Foltz y cols., 1997) así como factores ambientales, como rayos ultravioleta, radicales libres y estados de hipoxia (Ono y Han, 2000), son capaces de inducir p38.

La activación de p38 se lleva a cabo por MKK 3, MKK 4 y MKK 6 que son las MAPKK que fosforilan a p38 (figura 16). Cabe destacar también que MKK3 es la que principalmente fosforila a las isoformas $p38\alpha$, $p38\gamma$ y $p38\delta$. Asimismo, gran cantidad de proteínas pueden activan la vía MKK/p38, lo cual explica la gran cantidad de estímulos que son capaces de activar la cascada de p38. Por otro lado, la inhibición de p38 sucede por fosfatasas específicas que son capaces de defosforilar no solo a p38 si no también a ERK y JNK (Sun y cols., 1993).

Los factores diana de p38 son otras quinasas o factores de transcripción como ATF-2 y MEF 2. Se puede destacar que ATF-2 puede formar heterodímeros con factores de transcripción Jun y que así se asocia con AP-1.

La inhibición de p38 esta implicada en la atenuación de la transcripción de NF- κ B, por ello, p38 se piensa que se asocia a la activación de NF- κ B (Bergmann y cols., 1998; Nick y cols., 1999). MAP-KAP (MK2) es una de las muchas quinasas que se regulan por fosforilación directa de p38. Al utilizar ratones carentes del gen de MK2, se produce resistencia y mayor supervivencia al shock endotóxico producido por LPS por una reducción en la producción de TNF- α de aproximadamente el 90% (Kotlyarov y cols., 1999). Este efecto parece ser post-transduccional, ya que el mRNA no se reduce y la secreción de TNF- α no se afecta.

La principal respuesta biológica a la activación de p38 consiste en la producción y la activación de mediadores de la inflamación para iniciar el reclutamiento de leucocitos y su activación. Por ejemplo, el TNF- α induce la sobreexpresión de E-selectina, que se expresa en la superficie de las células

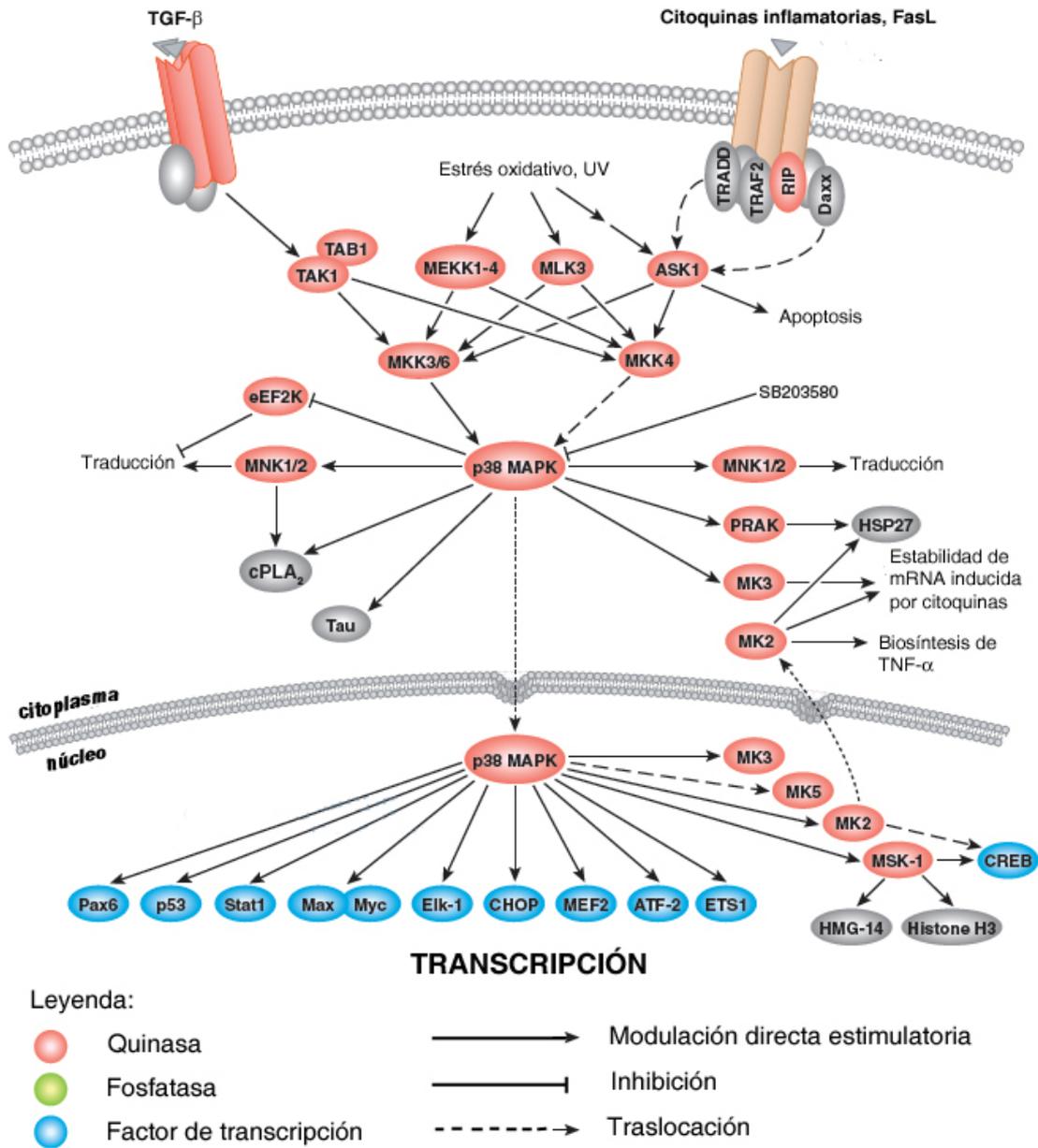
endoteliales durante el proceso de *rolling* de los leucocitos mediado por selectina y que se encuentra parcialmente regulado por p38 (Read y cols., 1997). Además, se ha demostrado que la estimulación con LPS de los neutrófilos produce activación de p38, y lleva a la adhesión celular y la regulación de la síntesis de $\text{TNF-}\alpha$ (Nick y cols., 1999).

Además, p38 puede regular la expresión de la molécula de adhesión de célula vascular 1 (VCAM-1) inducida por $\text{TNF-}\alpha$ en células endoteliales (Pietersma y cols., 1997). Asimismo, agentes quimiotácticos como la N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, el factor activador de plaquetas (PAF) y el $\text{TGF-}\beta$ pueden inducir quimiotaxis neutrofílica a través de la activación de p38 (Hannigan y cols., 1998; Zu y cols., 1998). Probablemente, p38 juega un papel fundamental en la regulación de una gran variedad de respuestas inmunológicas, como se puede observar en problemas inflamatorios, pero hay una superposición considerable con otras rutas de señalización como las descritas anteriormente de JNK y de ERK. En la enfermedad inflamatoria intestinal se ha descrito recientemente una sobreexpresión de $\text{p38}\alpha$ en los neutrófilos y macrófagos de la lámina propia del intestino (Waetzig y cols., 2002).

6.4. Interacciones entre MAP quinasas

A pesar de que las MAP quinasas generalmente actúan como módulos de señalización autónomos, existen interacciones entre las diferentes vías descritas. Se localizan estas interacciones a dos niveles diferentes: por activadores por encima de las MAP quinasas y por debajo de las mismas en la vía. El ejemplo más destacado de la primera es la GTPasa p21 Rac que es activada por varios mediadores de inflamación, en concreto el factor de estimulador de colonias 1 y el $\text{TNF-}\alpha$ (Peppelenbosch y cols., 1999). Rac activa la quinasa MEK p65 PAK, al menos en células mieloides y linfoides (Blume-Jensen y Hunter, 2001), la cual activa secuencialmente MKK3, 4, 6 y 7, siendo éstas responsables de la activación simultánea de p38 y de JNK, característica general observada en la mayoría de las reacciones proinflamatorias (Coso y cols., 1995; Minden y cols., 1995). Por otro lado, por debajo del alcance de las MAP quinasas existe también interacciones cruzadas. Así, cuando se activan las MAP quinasas, se produce activación de las llamadas fosfatasa de especificidad dual que defosforilan las MAP quinasas y restringen su acción a un corto periodo de tiempo. Puesto que la especificidad de estas fosfatasa es limitada, la activación de una MAP quinasa resultará en la desactivación de otras MAP quinasas. Así se pueden activar por un lado unas MAP quinasas simultáneamente con otras o inhibirse por la activación de otra, preponderando uno u otro dependiendo del contexto celular que suceda.

Figura 16.- Vía de señalización de p38.



6.5. MAP quinasas y pancreatitis aguda.

Como ya mencionamos anteriormente, las MAP quinasas se han relacionado con numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Como en otras patologías, los científicos dedicados a estudiar el páncreas, tanto en su correcta función como en la pancreatitis aguda, han visto en las MAP quinasas moléculas que podían tener un papel relevante, puesto que son proteínas clave en la señalización intracelular. En procesos de inflamación y estrés son rápidamente activadas y constituyen una diana esperanzadora para la modulación de los

procesos que suceden en la pancreatitis aguda, enfermedad que aún no tiene un tratamiento etiológico consensuado y efectivo, y que tiene un componente inflamatorio crucial.

6.5.1. Activación de las MAP quinasas en células acinares.

Se ha descrito que diferentes secretagogos son capaces de inducir la activación de las MAP quinasas. La activación de ERK en células acinares de páncreas se produce utilizando CCK con una concentración muy pequeña, del orden de 3 pM, y se produce también con secretagogos relacionados con la hidrólisis de fosfoinositol como la bombesina y carbacol por un mecanismo que incluye a la proteína quinasa C y la proteína tirosín quinasa (Duan y Williams, 1994). Esta activación depende de la activación de MEK y parece que RAS está también implicada (Duan y cols., 1995). Estudios más actuales han confirmado que la activación de ERK por CCK es proteína-quinasa-C dependiente, determinando que la vía fundamental de activación es a través de la familia de proteínas Raf (c-Raf-1, Raf-B y Raf- α) aunque Ras tiene un papel menor. La activación de la vía de ERK, utilizando como agente activador el factor de crecimiento epitelial, sucede de forma más tenue y se produce vía proteína tirosín quinasa y vía Ras, proteína quinasa C independiente (Williams y cols., 2002).

Tras el tratamiento con los mismos secretagogos, se produce también activación de p38 en células acinares, lo que se ha relacionado con la organización del citoesqueleto de dichas células, a través de la activación por fosforilación de la pequeña proteína de estrés térmico hsp 27 (Schafer y cols., 1998).

La quinasa JNK también se activa tras el tratamiento de células acinares con CCK *in vitro* si bien la dosis requerida es mucho mayor que *in vivo*. De nuevo, el carbacol y la bombesina son capaces de activar también a JNK pero la activación no sucede por mediación de la proteína quinasa C ni mediante incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} . En páncreas se produce además una activación *in vivo* tras el tratamiento con ceruleína a dosis suprafisiológicas en ratas y dosis normales de secreción. La quinasa ERK en cambio se activa de manera más moderada tras la administración de ceruleína (Dabrowski y cols., 1996).

Las concentraciones suprafisiológicas de colecistoquinina, que inducen predominantemente muerte celular por necrosis a los acinos pancreáticos aislados activan las tres familias de MAP quinasas, mientras que la irradiación de éstos con luz ultravioleta B, que produce predominantemente apoptosis, cursa con activación de p38 y ERK pero no de JNK. Puede que en estos modelos las

MAP quinasas tengan un papel fundamental en el tipo de muerte celular en particular a través de ERK y p38 (Dabrowski y cols., 2000b).

El factor transformador del crecimiento beta (TGF- β) activa también ERK y p38 pero no JNK. La activación de ERK se produce por las llamadas proteínas SMAD que activan a su vez a MEK. Posteriormente, MEK activa por fosforilación a la quinasa ERK. Al inhibir la activación de ERK, TGF- β es incapaz de activar el factor de transcripción AP-1 (Simeone y cols., 2001).

Se disponen en la actualidad de muchos datos que indican que las especies reactivas de oxígeno (ROS) también juegan un papel importante en la patogénesis de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Las ROS son también capaces de activar todas las MAP quinasas pero de forma independiente a la activación de la protein quinasa C (Dabrowski y cols., 2000a).

El grupo de Pandol ha descrito a los acinos pancreáticos como una fuente de expresión de citoquinas cuya producción se inhibe con los piridinil imidazoles SB-203580 y SB-202190 (Blinman y cols., 2000). En el proceso de aislamiento de los acinos se produce un aumento de la expresión de citoquinas y quimioquinas como IL-6, TNF- α , KC, MCP-1 y MIP-2. Todas estas expresiones se bloquean en gran parte tras el bloqueo de la activación de p38 y la inhibición es incluso mayor al utilizar junto con los piridinil imidazoles SB-203580 y SB-202190 el inhibidor de NF- κ B denominado MG-132 (Blinman y cols., 2000).

Hasta el momento, la comunidad se preguntaba qué era lo que activaba a las MAP quinasas en el páncreas y en la pancreatitis, pero no se prestó menor atención a la etapa siguiente, es decir, una vez activadas, ¿cómo se desactivan?. El grupo de Wagner estudió las MAP quinasas fosfatasa, con diez miembros diferentes identificados hasta la fecha, y con grandes homologías pero con diferente afinidad por los substratos, que eran las candidatas de realizar este papel. Utilizando el modelo de ceruleína se observó que la expresión de MKP-1, MKP-3 y de MKP-5 cambiaba de nula a muy elevada. Además, utilizando un inhibidor de MKP-1, se aumentó la actividad de JNK y no de p38 ni de ERK, demostrando así que la inhibición que MKP-1 realiza sobre JNK (Hofken y cols., 2000).

Se ha descrito un papel proliferativo de p38 en las células estrelladas de páncreas, que están a su vez implicadas en la fibrosis y la inflamación pancreática (Masamune y cols., 2003). La utilización de inhibidores de p38, como el SB203580 y el SB202190, bloquea la activación de éstas células y su proliferación. Un efecto parecido sucede al inhibir la vía de JNK que, sin afectar la vía de p38 ni de ERK en estas células, disminuye la proliferación de las células estrelladas pero no evita la transformación de las mismas.

Además, ERK y p38 se han relacionado con la regulación de la elongación de las proteínas tras la estimulación con CCK, regulando la fosforilación de eEF2 y del factor de elongación 2 que es el principal factor conocido de regulación de la elongación (Sans y cols., 2004).

6.5.2. MAP quinasas en la pancreatitis aguda experimental.

En la pancreatitis aguda inducida por ceruleína se ha descrito una activación de todas las MAP quinasas, y es especialmente rápida e intensa la activación de p38. Se conoce que existe activación basal de p38 y de ERK, pero no de JNK, que se activa con dosis mayores de ceruleína y más tenuemente, lo cual podría ser de importancia como posible diana para fármacos eficaces contra la pancreatitis (Wagner y cols., 1999). Se ha llegado incluso a proponer a JNK como un posible marcador de pancreatitis inducida por hiperestimulación del páncreas (Grady y cols., 1996).

Estudios *in vivo*, usando el modelo de ceruleína, con inhibidores de p38 han mostrado que la activación de p38 en el páncreas era beneficiosa para prevenir la aparición de necrosis pancreática y para prevenir el edema pancreático. Al inhibir la vía de p38 se producía más edema y más necrosis pancreática, rasgo que no es nada típico de una pancreatitis inducida por ceruleína (Wagner y cols., 2000; Fleischer y cols., 2001). Los mismos autores estudiaron también el efecto sobre los mismos parámetros de la inhibición de la MAP quinasa JNK mediante el uso de CEP-1347 observando en este caso efectos beneficiosos que se oponían a los encontrados al inhibir p38 (Wagner y cols., 2000; Fleischer y cols., 2001).

Se han ensayado en la pancreatitis inducida por ceruleína los inhibidores de ERK U0126 y PD98059 con objeto de inhibir MEK y consecuentemente la activación de ERK. Estos tratamientos redujeron sustancialmente la inflamación pancreática medida por el peso húmedo del páncreas y la actividad amilasa en suero (Clemons y cols., 2002). Histológicamente se mostró también mejoría en los animales con pancreatitis tratados con inhibidor de MEK de los no tratados con pancreatitis. Estos efectos se reproducen en ratas neutropénicas tratadas con vinblastina lo que indica que la acción de los inhibidores no depende de los neutrófilos (Clemons y cols., 2002).

Por último, con el compuesto SP600125 se obtuvieron mejores resultados lo que se explicaría por una inhibición conjunta de JNK (90%) y de ERK (45%). Asimismo se encontraron valores disminuidos de TNF- α y de ICAM-1 en páncreas (Minutoli y cols., 2004).

Los efectos en otros tejidos como pulmón o hígado, característico de la respuesta sistémica a la pancreatitis aguda necrótica se explican en parte por los monocitos/macrófagos activados en la sangre y la ascitis. Se ha descrito que cuanto más grave es la pancreatitis, más activación de p38 y de NF- κ B existe en dichas células y que este efecto correlaciona bien con los niveles encontrados de IL-6 y de TNF- α , efectores de daño extrapancreático (Liu y cols., 2003).

7. MUERTE CELULAR.

Desde hace mas de 50 años, en el estudio de la muerte de las células, se observó una distinción morfológica entre la clásica muerte patológica por necrosis y una muerte fisiológica, si bien no fue hasta 1972 cuando se acuñó el término de apoptosis (Kerr y cols., 1972). Sorprendentemente, se ha experimentado un espectacular progreso científico en este tipo de muerte celular programada, pero en cambio las vías bioquímicas que llevan a la célula a una muerte por necrosis están aún poco esclarecidas (Martin, 2001).

La apoptosis es un proceso coordinado mediado por componentes intrínsecos de la célula en la que juegan un papel importante tanto las caspasas (cisteín aspartato proteasas) como la mitocondria. La muerte celular programada se produce tras un proceso de condensación cromatínica y posterior troceado de la misma. La célula queda destruida, dejando como productos finales unas formas esféricas que mantienen la integridad de la membrana, sin producir inflamación (Bhatia, 2004).

La necrosis en cambio, se ha considerado durante muchos años como un proceso pasivo que ocurre tras una pérdida generalizada de ATP en la célula. Los canales iónicos dependientes de ATP se vuelven inefectivos, se produce una entrada masiva de calcio, de sodio y de agua, lo que ocasiona el hinchado de la célula. Se desencadena a continuación la destrucción del citoesqueleto celular y, finalmente, la rotura de la membrana celular provoca el colapso total de la célula. El vertido de contenido celular al exterior comporta una inflamación asociada a la muerte por necrosis, lo cual lo diferencia del proceso de la apoptosis (Bhatia, 2004). Los factores que producen la necrosis celular son fundamentalmente extrínsecos, como son los cambios osmóticos, térmicos, tóxicos, isquémicos, aunque también de tipo traumático. Datos recientes sugieren sin embargo que existen ejemplos de muerte por necrosis fisiológicos y que pueden ser incluso regulados o programados. Muchos estímulos, como son las citoquinas, la isquemia o los patógenos, pueden provocar tanto apoptosis como necrosis a las mismas células (Proskuryakov y cols., 2003).

En la pancreatitis aguda se observa clínica y experimentalmente una progresiva muerte celular en el tejido pancreático. Los mecanismos de esta muerte están aun en la actualidad poco claros, pero la regulación de los mecanismos que conducen a la célula bien a la apoptosis o bien a la necrosis pueden ser clave para explicar esta enfermedad. Puesto que la severidad de la enfermedad está relacionada inversamente con la apoptosis y directamente con la necrosis de las células acinares (Kaiser y cols., 1995), el estudio de la apoptosis,

y más aún de la necrosis, es fundamental para encontrar un tratamiento efectivo contra la pancreatitis aguda.

7.1. Necrosis.

Tras la aparición del término apoptosis, la necrosis se ha considerado como un proceso de muerte perturbado o incluso accidental. La necrosis es el tipo de muerte celular que ocurre en varias condiciones neurodegenerativas y como consecuencia de daño isquémico en diversos órganos, incluido el cerebro y el corazón. La necrosis se asociaba a un proceso pasivo que ocurre como consecuencia de la pérdida de ATP. Investigaciones recientes sugieren la necrosis como un proceso “activo” en la que se produce una acumulación de iones Na^+ y Ca^{2+} y que originan cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Se han descubierto rasgos claramente apoptóticos en células que no poseen núcleo (citoplastos). La diferencia entre apoptosis y necrosis es entonces muy estrecha, ya que no es necesaria una fase de síntesis de proteínas por el núcleo para fases tardías de la apoptosis (Jacobson y cols., 1994).

Morfológicamente se describe a la necrosis como un hinchamiento de la célula, con posterior colapso de la membrana, y lisis celular rápida. Durante la apoptosis se produce primero un encogimiento con condensación cromatínica para finalmente aparecer bien empaquetados los denominados cuerpos apoptóticos. El término oncosis enfatiza el hecho del hinchamiento celular producido en la necrosis (de *oncos*=hinchamiento) y sería este término el opuesto a la apoptosis. Se podrían considerar como los extremos de un espectro de posibilidades de muerte celular. Para tener un criterio que nos ayude a la clasificación, se ha propuesto definir necrosis como la muerte que se acompaña de rápida liberación extracelular de contenido celular, en oposición a lo que ocurre en la apoptosis. Cabe resaltar que en los estadios finales de apoptosis se produce una alteración en la membrana que produce liberación de contenido, pero *in vivo* no sucede ya que se eliminan los cuerpos apoptóticos por la acción de los macrófagos (Proskuryakov y cols., 2003) y de las células adyacentes.

Entre los agentes que pueden causar necrosis tenemos los factores extremos, como la temperatura, la ósmosis y el pH, los fenómenos de isquemia, los tóxicos, y los efectos traumáticos, clásicamente definidos para la necrosis extrema como oncosis. También producen necrosis otros agentes como por ejemplo varios virus, protozoos y bacterias, así como sus toxinas. Los radicales libres, las citoquinas, los componentes del sistema inmune, así como los *natural killer* activados y macrófagos, también producen necrosis que en ocasiones responde a una fisiología normal de los organismos. Este hecho se pone en evidencia tras observar animales genéticamente modificados, como por ejemplo los deficientes en caspasa-3 o -9, y que aún así pierden en el desarrollo fetal la

médula espinal y las neuronas madre cerebrales (Smith y cols., 1996). También se observan fenómenos necróticos de tipo fisiológico y con grandes evidencias de ser programados en la pérdida de las células interdigitales, que se consideraba como sinónimo de muerte celular programada (Chautan y cols., 1999).

7.1.1. Mediadores extracelulares, y necrosis.

Multitud de moléculas pueden causar necrosis tras la interacción con las membranas de las células y sus receptores. Muchas de ellas están además implicadas en la inflamación y en la infección. En la tabla 2 se resumen los principales ligandos y receptores capaces de inducir muerte por necrosis. Cabe destacar que la gran mayoría de estas moléculas pueden activar tanto la apoptosis como la necrosis. La puesta en marcha de un mecanismo u otro depende del tipo y la intensidad del estímulo, así como del tipo celular y su fenotipo bioquímico. La existencia de moléculas que, tras su unión específica con receptores de membrana, causen necrosis sugiere que la necrosis no es un proceso pasivo sino que puede estar regulado.

Tabla 2.- Ligandos y receptores capaces de inducir muerte por necrosis

Nombre	Observaciones	Referencias
IL-1b, TNF- α y IFN- γ	Citoquinas capaces de producir bien necrosis o apoptosis.	(Saldeen, 2000)
Endotoxina	Muchas otras toxinas de microorganismos también.	(Medan y cols., 2002)
Miembros de la familia del receptor TNF	TNF, FAS, TRAIL.	(Holler y cols., 2000) (Boone y cols., 2000)
Activación de receptores purinérgicos	Mediante aporte de ATP exógeno o bacterias.	(Schulze-Lohoff y cols., 1998; Zaborina y cols., 2000)
Activación de subtipos de receptores glutamato		
Factores de supervivencia	Insulina y NGF pueden causar necrosis	(Noh y cols., 1999; Hong y cols., 2000)
Activación de receptores de glucocorticoides	Puede ser antinecrótico o pronecrótico.	(Morita y cols., 1999)

7.1.2. Iones en la necrosis.

Es bien conocido que cuando se compromete la membrana, la célula pierde el equilibrio existente entre los iones extracelulares y los intracelulares. El intento de recuperar los niveles anteriores produce una depleción de ATP que, finalmente, provoca un fallo de las bombas iónicas. Se produce entonces una sobrecarga de sodio que, unido a la depleción de ATP, se considera determinante en el desarrollo necrótico.

Se produce también un aumento del calcio dentro de la célula el cual está mediado por canales selectivos y no selectivos para este ión. Se considera que el calcio es uno de los más potentes inductores y mediadores de la muerte celular. El calcio es capaz de activar proteasas, endonucleasas y, además, puede disminuir el potencial de membrana de la mitocondria. Retirando el calcio del medio, o bloqueando los canales específicos del mismo, se protege a la célula frente a la muerte por necrosis en la anoxia y en la retirada de los nutrientes (Yoshioka y cols., 2000).

7.1.3. Radicales libres en la necrosis.

Los radicales libres producidos por los macrófagos, por la xantina oxidasa, o la mitocondria entre otros pueden producir compuestos que tienen capacidad de producir necrosis.

El peróxido de nitrógeno se ha utilizado ampliamente como un productor de necrosis y de apoptosis. La cantidad de glutatión se ha relacionado asimismo con la resistencia de la célula a la muerte por apoptosis o por necrosis (Higuchi, 2004). El NO se ha visto involucrado en la regulación de la apoptosis puesto entre otros mecanismos conocidos puede inhibir la caspasa-3. El NO puede reaccionar químicamente con el superóxido, produciendo peroxinitrito, molécula muy reactiva que puede causar necrosis y que se utiliza experimentalmente como sustituto de la acción de las citoquinas a las células efectoras.

En la mayoría de los casos los antioxidantes suprimen la muerte celular por apoptosis o por necrosis producida por radicales libres. Parece que el estrés oxidativo induce apoptosis cuando las células pueden mantener su capacidad reductora mientras que la necrosis se dispara cuando la capacidad reductora está deteriorada.

7.1.4. MAP quinasas y necrosis.

La ruta de quinasas que por excelencia está relacionada con la apoptosis es la de JNK, dependiente de la mitocondria, de la salida de citocromo C y de

Smac/DIABLO (Aoki y cols., 2002), si bien otros datos la relacionan más bien con la aparición de inflamación y no con la apoptosis (Nishitai y cols., 2004). Está descrita también la relación de su activación con la necrosis, como sucede al observarse una menor muerte por necrosis en las células miogénicas tras la privación de energía (Gabai y cols., 2000). Existen también evidencias de la implicación de p38 en la apoptosis y la necrosis, si bien los resultados son en ocasiones contradictorios. Se ha descrito asimismo el aumento de la supervivencia (Park y cols., 2002) pero también aumento de la muerte celular por su activación (Porrás y cols., 2004). Por último, la activación de ERK parece relacionarse con resistencia a la apoptosis celular (Xia y cols., 1995).

En cuanto al papel que desempeñan estas rutas de quinasas en la necrosis parece ser idéntico tanto si se trata de MAP quinasas pro- o anti-apoptóticas (como JNK y p38) como si se trata de antiapoptóticas (como ERK).

7.1.5. Mitocondria, Bcl-2 y necrosis.

En la literatura está bien establecido que la mitocondria juega un papel fundamental en el destino de la célula durante periodos de estrés. Es el orgánulo que genera la fuente principal de ATP de la célula que, en último término, es tan importante en la necrosis. Por otro lado, la mitocondria es capaz de activar la vía intrínseca de la apoptosis mediante la liberación de citocromo C, además de ser una de las principales fuentes de radicales libres.

Si los niveles de ATP no son los adecuados, se produce un cambio de muerte desde la forma apoptótica a la necrótica. Así, si se añaden inhibidores de la cadena de transporte de electrones, se pueden producir necrosis si no existe capacidad de producir suficiente ATP por otra vía (Kabakov y Gabai, 1994). De cualquier forma deben entrar otros factores en juego, ya que se ha descrito que también existe necrosis sin depleción de ATP. En este sentido, la formación de radicales libres y la situación de permeabilidad transitoria de la membrana de la mitocondria pueden causar salida de calcio y de proteasas que finalmente causen necrosis. Por ejemplo, si se adicionan inhibidores de la permeabilidad transitoria de la membrana de la mitocondria se previene *in vivo* la muerte por necrosis (Di Lisa y cols., 2001).

Otro de los factores que afectan a la necrosis y la apoptosis es la familia de Bcl-2 cuya acción antiapoptótica y antinecrótica parece consistir en realidad en la preservación de la integridad de la membrana de la mitocondria.

7.1.6. Proteínas de shock térmico, proteasas, nucleasas y fosfolipasas en la necrosis.

Se han descrito en la bibliografía otras moléculas relacionadas con la necrosis celular. Se ha estudiado la relación entre proteínas de shock térmico, (como la Hsp70 y Hsp27) en la prevención de la muerte celular suponiéndose que las MAP quinasas pueden estar implicadas en su acción (Gabai y cols., 2000).

La inhibición de las caspasas supone en muchos modelos experimentales la incapacidad de muerte por apoptosis e incluso, en ocasiones, se exagera la necrosis. Sin embargo, en la muerte por necrosis la inhibición de las caspasas tiene efectos más diversos y depende de la célula, el estímulo y el ATP. Las caspasas pueden activar otras proteasas como son la catepsinas, calpaína y serín proteasas que se relacionan con la ejecución de la necrosis.

La necrosis se acompaña también de una degradación aleatoria de DNA. La principal nucleasa apoptótica es la DNAsa activada por caspasas, mientras que en la necrosis probablemente están más implicadas las DNAsas I y II que son caspasa independientes. Se produce también activación de fosfolipasas, especialmente la fosfolipasa A2 calcio-dependiente, que en la apoptosis se destruye por caspasas para prevenir los productos inflamatorios que produce (Adam-Klages y cols., 1998). Asimismo el bloqueo de la enzima previene la muerte por necrosis en células MCF-7 inducidas con TNF- α (El Mahdani y cols., 2000).

7.2. Apoptosis.

La apoptosis se define como los cambios distintivos morfológicos y bioquímicos que conducen a una muerte celular programada. Se trata de una compleja secuencia de eventos de los cuales algunos son morfológicamente identificables (Kerr y cols., 1972). La fase efectora está caracterizada por la activación de endonucleasas, transglutaminasa tisular y proteasas celulares, especialmente caspasas, así como una disfunción mitocondrial. Si se alcanza un punto de no-retorno, se fija el destino de la célula y comienza la fase de degradación. En esta fase, se produce una rotura extensiva de los ácidos nucleicos y de las proteínas, de forma que se produce una reestructuración del citoesqueleto. La fase de limpieza se caracteriza por una eliminación en la mayoría de los tejidos de los cuerpos apoptóticos formados por los macrófagos, que los fagocitan. Recientemente se ha caracterizado otro tipo de muerte celular sin fragmentación nuclear, que se ha denominado paraptosis, que parece ser un proceso activo y con síntesis de proteínas como ocurre en la apoptosis (Sperandio y cols., 2000).

7.2.1. Caspasas y apoptosis.

Las caspasas son una familia de proteasas de cisteína que se relacionan con la enzima convertidora de interleuquina 1 β . Son proteínas que permanecen inactivas en forma de proenzimas y que, cuando son activadas por proteólisis, seccionan una multitud de substratos celulares específicamente por sus residuos aspartato (Hengartner, 2000). Se han identificado hasta el momento catorce de estas proteasas de cisteína, y se han denominado con números del uno al catorce (Thornberry y Lazebnik, 1998). Estas proteasas se consideran las proteínas ejecutoras de la apoptosis, ya que la gran mayoría de los cambios morfológicos y bioquímicos se deben a ellas.

Las enzimas se dividen funcionalmente en dos grandes subfamilias. Por un lado están las relacionadas con la maduración de las citoquinas, como la IL-1 β y la IL-18, que promueven funciones proinflamatorias. A este grupo pertenecen la caspasa-1, la 4 y la 5. Por otro lado, tenemos las caspasas que actúan como parte de la vía apoptótica, subdividiéndose en iniciadoras, como la 2, la 8, la 9 y la 10, y en efectoras, como la 3, la 6 y la 7 (Thornberry y Lazebnik, 1998). Tras la activación por dimerización de los monómeros de las caspasas iniciadoras, éstas son capaces de ejercer capacidad proteolítica y activan a las caspasas efectoras que están predominantemente en el citosol en forma de dímeros (Green, 2003). Las caspasas efectoras se encargarán de cortar numerosas proteínas del núcleo, la membrana y el citoplasma de la célula, y de activar DNAsas, que facilitan la digestión del DNA. Como resultado de todo ello, se produce la condensación del núcleo, la fragmentación del DNA y finalmente, se forman los cuerpos apoptóticos característicos de este tipo de muerte celular.

Existen dos vías diferenciadas que producen la activación de las caspasas, la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía extrínseca se inicia por unión de receptores transmembrana de muerte (como los receptores CD95, el receptor de TNF- α y el receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF- α) a caspasas próximas a la membrana. Se produce una activación de las mismas para que, posteriormente, se rompan y se activen las caspasas efectoras. Esta vía puede ser regulada por la proteína inhibidora tipo c-FLICE, que es capaz de inhibir en el principio de la vía a las caspasas activadoras, y también por las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) que afectan tanto a las activadoras como a las efectoras. La vía intrínseca requiere de la participación de la mitocondria la cual tiene un papel activo en la apoptosis (Bhatia, 2004).

7.2.2. Mitocondria y apoptosis.

La mitocondria juega un papel primordial en la apoptosis. Su importancia se comenzó a elucidar tras los estudios de Kroemer, que observó la caída del

potencial de membrana de la misma justo antes del comienzo de la apoptosis (Zamzami y cols., 1995). Sin el potencial de membrana adecuado, la mitocondria no puede sintetizar el ATP por fosforilación oxidativa. Más tarde, se describió la liberación por parte de la mitocondria de citocromo C como un paso inicial de la apoptosis (Liu y cols., 1996). Hoy se supone que la mitocondria forma parte de la vía intrínseca al liberar, tras perturbarse su membrana, citocromo C y otras proteínas mitocondriales, como es la proteína Smac/DIABLO (segundo activador de las caspasas derivado de la mitocondria) y la proteína HtrA2 (proteasa A2 con requerimiento alto de temperatura). El citocromo C actúa con el factor de activación de proteasas apoptóticas (Apaf-1) para inducir la activación de la caspasa-9, que inicia la cascada de la apoptosis. Por otro lado, la proteína HtrA y Smac/DIABLO se deben unir para antagonizar la actividad de las IAPs (Bhatia, 2004).

La liberación de citocromo C no es un proceso que siempre produzca apoptosis, de manera que el proceso de decisión mitocondrial de activación de la apoptosis es más complejo. Otras proteínas, cambios iónicos e incluso radicales libres de oxígeno actúan de forma aun poco clara para que finalmente la célula entre en apoptosis. La activación de la caspasa-9 por el citocromo C requiere de la formación de un complejo denominado apoptosoma, de forma que el citocromo C liberado se une a monómeros de Apaf-1 en el citosol, induciendo un cambio conformacional que permite la asociación estable con el trifosfato de adenosina. Los monómeros de Apaf-1 se ensamblan en el apoptosoma formando un complejo heptamérico, que primeramente se une a la procaspasa-9, para luego hidrolizarla proteolíticamente liberando la caspasa-9 activa. El proceso culmina con la muerte por apoptosis de la célula (Nicholson y Thornberry, 2003).

Para que se produzca la liberación del citocromo C se debe separar la unión que le ancla a un fosfolípido de cardiolipina en la membrana interior de la mitocondria. La liberación parece que responde entre otros factores a la peroxidación. Además, el citocromo C puede ser nitrosilado en la apoptosis aumentando su efecto proapoptótico (Nicholson y Thornberry, 2003).

La permeabilización de la membrana de la mitocondria está regulada por la familia de proteínas pro y antiapoptóticas de Bcl-2. Entre las proapoptóticas cabe destacar a Bax, a Bak y a Bok y, entre las antiapoptóticas, a la propia Bcl-2, a Bcl-w, a Mcl-1 y a A1. Existe una tercera clase de moléculas implicadas, que tienen homología sólo con el dominio BH3 homólogo con Bcl-2, y que logran activar la familia proapoptótica de la Bcl-2 o inactivar miembros antiapoptóticos. La familia de proteínas tipo BH3 incluye a Bin, a Bid, a Bad, a Bik, a NNIP3, a Noxa, a Puma y a Hrk (Huang y Strasser, 2000). Se ha observado que, cantidades pequeñas de péptidos BH3 seleccionados, facilitan la salida de citocromo C de la mitocondria.

Esta acción se inhibe con Bcl-2 o con Bcl-X_L y se reduce con péptidos mutantes parecidos a los BH3 (Polster y cols., 2001).

Todas estas moléculas actúan conjuntamente, de manera que al final, se establece una relación entre las que son proapoptóticas y las antiapoptóticas que han salido al citosol. Además, las proteínas de la familia Bcl-2 pueden formar heterodímeros modificando su actividad, pudiendo llegar incluso a neutralizar su capacidad de modificar la apoptosis. También pueden unirse a miembros del grupo de proteínas tipo BH3 resultando en multitud de posibilidades y de efectos (Huang y Strasser, 2000).

Existe gran debate sobre la permeabilidad de la membrana de la mitocondria, y se habla de permeabilidad mitocondrial transitoria a la apertura de poros que conduce a la salida de las moléculas pro y antiapoptóticas. Estos poros se han denominado poros de permeabilidad transitoria de alta conductividad. Los modelos estructurales de los poros de permeabilidad transitoria están aún en debate y se necesitan más estudios que unifiquen los datos hasta la fecha (Kim y cols., 2003). En cualquier caso el efecto neto final es el mismo, la salida regulada de agentes proapoptóticos, la activación de las caspasas y por último la muerte de la célula.

En la mayoría de las condiciones, la interacción entre la vía intrínseca y la vía extrínseca es mínima, pero existen situaciones en las que no existe independencia de ambas vías. Por ejemplo, la caspasa-8 puede activar proteolíticamente a Bid, y activadores de la vía intrínseca pueden sensibilizar a la célula a ligandos que activen la vía extrínseca (Bhatia, 2004).

7.3. Necrosis y apoptosis y en la pancreatitis aguda.

Como se ha indicado anteriormente, en la pancreatitis aguda se produce mortalidad de las células pancreáticas y esta mortalidad se relaciona con la severidad de la enfermedad. Clásicamente, se ha considerado la necrosis como la mayor forma de muerte celular en la pancreatitis aguda (Nevalainen y Aho, 1992; Kloppel y Maillet, 1993), mientras que la apoptosis se ha considerado como la mediadora de la atrofia del órgano (Walker y cols., 1992). Estudiando detenidamente los modelos experimentales utilizados en el estudio de la enfermedad se ha descrito que la pancreatitis aguda severa está asociada a la necrosis con poco porcentaje de apoptosis, mientras que la pancreatitis aguda leve está asociada principalmente con muerte por apoptosis y con un bajo porcentaje de necrosis (Kaiser y cols., 1995; Gukovskaya y cols., 1996).

De los pioneros en estudiar la apoptosis y la necrosis en la pancreatitis fue el grupo del Prof. Pandolfi, en la Universidad de Los Ángeles. Utilizando el modelo de hiperestimulación con ceruleína, describió la estimulación del factor activador de las plaquetas (PAF), que controla tanto la apoptosis como la quimiotaxis neutrofílica en el páncreas. Los neutrófilos, una vez reclutados, atacan a las células acinares transformando la muerte por apoptosis en muerte por necrosis (Sandoval y cols., 1996). Siguiendo la misma línea, el mismo grupo describió la existencia de receptores de muerte de TNF- α . Las células pancreáticas producen y liberan dicho receptor y responden muriendo por apoptosis tras la activación del mismo (Gukovskaya y cols., 1997). Resultados posteriores han descrito que el TNF- α en células AR-42J ejerce tanto acciones apoptóticas, vía caspasas, como antiapoptóticas, vía NF- κ B y MAP quinasas (Malka y cols., 2000). Se ha descrito también que la muerte por la ligadura del conducto bilio-pancreático es mayoritariamente apoptótica y está regulada por p53 (Scoggins y cols., 2000).

En otros trabajos se ha observado la apertura del poro de permeabilidad transitoria en ratas estimuladas con ceruleína (Schild y cols., 1999). Además, se ha estudiado el papel de la vía intrínseca en la apoptosis de las células acinares, mostrando que la colecistoquinina estimula la muerte celular por medio de las caspasas, y promueve la liberación de citocromo C y la despolarización de la mitocondria (Gukovskaya y cols., 2002a). La disfunción de la mitocondria se produce tanto dependiente del poro de permeabilidad transitoria, que libera citocromo C, como por vía independiente del poro, mediante despolarización de la membrana. Las alteraciones de la mitocondria se regulan por caspasas que actúan a nivel superior como podría ser muy probablemente el caso de la caspasa-8 (Gukovskaya y cols., 2002a). También se ha descrito a las caspasas como protectoras frente a la necrosis y a la activación de la tripsina de manera que se podría explicar la correlación entre una mayor apoptosis con una menor necrosis y, por tanto, con menor severidad de la enfermedad (Gukovskaya y cols., 2002a).

II-OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis ha sido determinar los mecanismos responsables de la depleción de glutatión en el páncreas en la pancreatitis aguda experimental.

Los objetivos concretos han sido los siguientes:

- 1.- Estudiar la regulación de la expresión génica de la γ -glutamil cisteína sintetasa en la pancreatitis aguda necrótica inducida por taurocolato en ratas.
- 2.- Determinar el efecto del tratamiento con pentoxifilina y con oxipurinol sobre la activación de las proteín quinasas activadas por mitógenos en páncreas y su relación con la depleción de GSH en la pancreatitis aguda inducida por taurocolato en ratas.
- 3.- Estudiar la depleción de glutatión en la pancreatitis aguda inducida por ceruleína en ratones deficientes en el gen de TNF- α y en los de sus receptores TNF-R1 y TNF-R2.
- 4.- Investigar el papel de las proteasas intracelulares en la depleción de glutatión en las células acinares de páncreas.
- 5.- Estudiar los efectos de la prevención de la depleción de glutatión sobre la muerte celular inducida por taurocolato.

***III-MATERIALES Y
MÉTODOS***

1. MATERIALES.

1.1. Animales de experimentación.

Los animales de experimentación utilizados para la pancreatitis aguda necrótica experimental inducida con taurocolato y para la pancreatitis edematosa inducida con ceruleína fueron ratas Wistar macho jóvenes de 250 a 350 g de peso corporal. Para los estudios con animales *knockout*, se utilizaron ratones de 25 a 30 gramos de peso corporal.

Los animales se mantuvieron en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, bajo condiciones de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz /oscuridad (12 /12 h) constantes. Se alimentaron con una dieta de laboratorio estándar que contenía 590 g de carbohidratos, 30 g de lípidos, y 160 g de proteínas por kilogramo de dieta, Leticia, Barcelona y agua corriente *ad libitum*.

La inducción de la pancreatitis con taurocolato y el sacrificio de los animales se llevó a cabo previa inducción anestésica con ketamina (80 mg/kg) y acepromacina (2,5 mg/kg) (Pfizer, Suiza) por vía intraperitoneal. Se utilizó también pentotal (50 mg/kg) para la realización del estudio de los efectos del cotratamiento con pentotal y pentoxifilina. La manipulación de los animales y los protocolos de experimentación han sido realizados de acuerdo con las normas de experimentación animal de la Unión Europea (N.E.A.U.E. 1999).

1.2. Aparatos.

□ Balanzas.

Balanza de precisión SARTORIUS, modelo TECATOR 6110, con una sensibilidad de ± 0.0001 g. También se ha utilizado una balanza SARTORIUS modelo PT 1200, con una sensibilidad de ± 0.1 g

□ Centrífugas.

Para las centrifugaciones a baja velocidad se utilizó una centrífuga de la firma SORVALL, modelo GLC-1. Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en una centrífuga refrigerada marca HERAEUS, modelo Sepatech Biofuge 17RS.

❑ Espectrofotómetro.

Se utilizó un espectrofotómetro de la marca KONTRON modelo Uvikon 810 termostatizado.

❑ Agitador magnético.

Marca Selecta, modelo Agimatic-S.

❑ pHmetro.

El pHmetro empleado es de la marca CRISON, modelo MicropH 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.

❑ Baño termostatizado.

Se utilizó un baño provisto de agitación automática regulable, marca SBS modelo BT.

❑ Fluorímetro.

Marca Perkin Elmer, modelo LS 50B.

❑ Homogeneizador.

Marca IKA-WERK, modelo Janke y Kunkel RW 20 DZH.

❑ Autoclave.

Marca Selecta, modelo Autester-G.

❑ Termociclador.

Marca BIORAD, modelo iCycler iQTM Multi-Color, Real-Time PCR Detection System.

❑ Equipo de PCR en tiempo real.

Marca Perkin-Elmer, Applied Biosystems modelo ABI GeneAmp 7000 Sequence Detection System

❑ Sonicador.

Sonicador modelo Vibra-Cell VCX-500 sonicator.

❑ Cubetas de electroforesis y electrotransferencia

Cubeta de la casa BIORAD, modelo Mini-PROTEAN 3 Cell.

❑ Fuente de alimentación de electroforesis.

Marca SIGMA, modelo PS 250-2, y marca BIO-RAD, modelo 200/2.0 Power Supply.

❑ Dispositivo fotográfico.

Sistema fotográfico marca Polaroid, modelo MP 4+.

❑ Campana de flujo laminar vertical.

Marca CULTAIR modelo B100.

❑ Estufa termostatzada de cultivos.

Marca NAPCO modelo 5415IR, CO₂ System.

❑ Microscopios.

Microscopio óptico NIKON SE.

Microscopio óptico invertido ZEISS Modelo ID03.

Microscopio confocal Modelo Leica TCS SP2 con 3 láseres Ar/HeNe/HeNe que proporcionan 6 líneas: Rojo (HeNe 633nm), Verde (HeNe 543nm), Azul (Ar 458nm, 476nm, 488nm, 514nm) y un láser ultravioleta con 2 líneas (351nm, 364nm). Posee la capacidad de excitación multifotónica compatible con láser UV en el mismo sistema. Tiene incorporada una cámara de cultivo acoplada al microscopio confocal, lo cual permite realizar experimentos in vivo durante largos periodos de tiempo manteniendo una concentración de CO₂ determinada y una temperatura constante.

Microscopio de Fluorescencia invertido NIKON Diaphot 300.

❑ Bomba de perfusión.

Bomba de perfusión para la correcta perfusión de taurocolato de la marca Harvard Instruments Modelo Pump 11

1.3. Reactivos.

Enzimas

Peroxidasa de rábano, Taq Polimerasa, AMV retrotranscriptasa de Boehringer Mannheim, TTh DNA polimerasa. Glutación-S- transferasa, glutatión reductasa, RNAasa I de SIGMA. Colagenasa de Worthington biochemical corp., New Jersey, USA.

Otros reactivos

Oxipurinol (Sigma, St Louis, Miss, USA), pentoxifilina (Robert, Barcelona, España), pentotal (Vétoquinol, Madrid, España), taurocolato sódico (Sigma, St Louis, Miss, USA), cóctel de inhibición de proteasas para tejidos de mamíferos (Sigma, St Louis, Miss, USA ref. P-8340) e inhibidores de MAP quinasas (Calbiochem, Alemanina).

El resto de reactivos se obtuvo de los laboratorios: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Molecular Probes, Panreac, Merck Biochemica (Alemania), Gibco BRL Life Technologies (USA) y Calbiochem (Alemania).

2. MÉTODOS.

2.1. Modelo experimental de pancreatitis aguda necrótica.

2.1.1. Descripción del modelo.

El modelo de pancreatitis aguda necrótica utilizado en este trabajo ha sido el de infusión retrógrada de sales biliares (taurocolato sódico) desarrollado por Aho y colaboradores (Aho y cols., 1980), que intenta aproximarse a los fenómenos que ocurren en una pancreatitis de origen biliar. En este modelo, la secuencia de acontecimientos que tienen lugar durante las primeras fases de la PA parece deberse al efecto detergente del ácido taurocólico, que desestabiliza las membranas celulares. Esto provoca la activación de las enzimas proteolíticas por dos vías: bien incrementando la concentración de calcio en el citoplasma celular (activándose las proteasas dependientes del calcio), o bien, como parece más probable, facilitando la fusión de los lisosomas con los gránulos de zimógeno (produciendo el paso de tripsinógeno a tripsina)(Nakae y cols., 1995).

Tras anestesiar al animal, la inducción de la PA se lleva a cabo bajo estrictas medidas de asepsia (rasurado y pincelado de los animales con povidona yodada, figura 18) como se describe a continuación: se practica una laparotomía media, se eviscera y localiza el duodeno, el cual se punciona en su borde antimesentérico para canalizar el conducto biliopancreático con una cánula de 0.6 mm de diámetro (Clay Adams PE10) (figura 19). Después de clampar dicho conducto a su salida del hígado, para evitar su perfusión (figura 20), se comienza la perfusión de taurocolato al 3.5% (Sigma, St Louis, Miss, USA) a un ritmo de 0.1 ml/100 g de peso del animal durante un minuto (figura 21) utilizando una bomba de perfusión (Harvard Instruments, figura 17). Una vez concluida la perfusión, se retira el clamp y la cánula, se reintegran las asas intestinales al interior de la cavidad abdominal y se cierra la laparotomía con seda de 3/0.

En el grupo de animales tratados con pentoxifilina, ésta se administró mediante perfusión intravenosa en la vena femoral (figura 22) inmediatamente después de la inducción con taurocolato, a una dosis de 12 mg/kg de peso del animal y a un ritmo de 0.066 ml/min durante 30 min. La solución de oxipurinol utilizada fue de 5 mmolar preparada en bicarbonato 100 mM y la administración se realizó de la misma manera, por canulación de la vena femoral izquierda del animal (figura 22) a un ritmo de 0.066 ml/min durante 30 min, tras lo que se comprime la vena y se sutura la piel con seda de 3/0. En el grupo control se administró suero fisiológico (NaCl al 0,9 %) en la vena femoral a un ritmo de 0,066 ml/min durante 30 min para comparar con el grupo tratado.

Figura 17.- Inducción de pancreatitis con taurocolato: Material necesario



Figura 18.- Inducción de pancreatitis con taurocolato: Preparación del animal.



Figura 19.- Inducción de pancreatitis con taurocolato: Canulación del conducto biliopancreático para la perfusión del taurocolato.

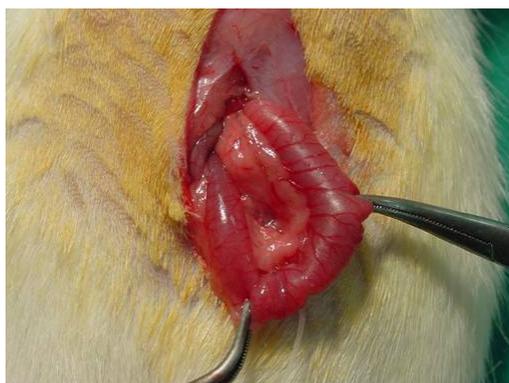


Figura 20.- Inducción de pancreatitis con taurocolato: Clampaje proximal del conducto biliopancreático para evitar el reflujo de taurocolato hacia el hígado.



Figura 21.- Inducción de pancreatitis con taurocolato: Se observan áreas de necrosis en el páncreas tras la perfusión con taurocolato.



Figura 22.- Canulación de la vena femoral para la administración de los tratamientos de oxipurinol y pentoxifilina



En el modelo de pancreatitis aguda necrótica experimental inducida por taurocolato, la severidad y la mortalidad dependen de la concentración administrada de la sal biliar. Así, con una concentración de taurocolato del 3.5%, la mortalidad es de aproximadamente un 25% en las primeras 72 h, mientras que con una concentración del 5% la mortalidad es del 100% (Aho y cols., 1980). El modelo empleado tiende a producir una PA severa, rápidamente destructiva y con una elevada mortalidad, con la ventaja de que dicha mortalidad no se debe sólo a los efectos locales, sino sobre todo a los efectos sistémicos precoces que provoca, tal y como ocurre en los humanos. Además, la homogeneidad de los resultados obtenidos cuando la perfusión se realiza con bomba de perfusión, lo convierte en un modelo idóneo para el estudio de los efectos tanto locales como sistémicos de la PA necrótica experimental.

2.1.2. Diseño del estudio de la pancreatitis aguda necrótica.

2.1.2.1. Grupos de estudio para conocer la cinética de la depleción de glutatión, la regulación de la expresión génica de la γ -glutamil cisteína sintetasa y la activación de las MAP quinasas en la pancreatitis aguda experimental necrótica.

En esta primera parte del trabajo hemos estudiado la depleción de glutatión causada por el taurocolato en el páncreas y la regulación génica que sufre la γ -glutamil cisteína sintetasa, enzima limitante para la síntesis del glutatión. También hemos estudiado la activación que experimentan las MAP quinasas en la pancreatitis aguda necrótica experimental. Para ello, se han distribuido las ratas utilizadas en los siguientes grupos:

- ❑ Grupo 1: animales anestesiados y sacrificados a las 0 h, que serán utilizados como control.
- ❑ Grupo 2: animales sacrificados 30 min tras la inducción de la pancreatitis aguda.
- ❑ Grupo 3: animales sacrificados 1 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.
- ❑ Grupo 4: animales sacrificados 3 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.
- ❑ Grupo 5: animales sacrificados 6 h tras la inducción de la pancreatitis aguda

Tras el sacrificio de dichos animales, se extrajo el páncreas para determinar los niveles de glutatión, aislar RNA y realizar la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina. Se incluyó un sexto grupo de animales sacrificados a las 9 h tras la inducción de la pancreatitis aguda, para el estudio de los niveles de glutatión tardíos.

Se determinaron los niveles de RNA mensajero de la GCS tanto en la cabeza como en la cola del páncreas y se estudió la unión de la polimerasa tanto a exones como a los promotores de los genes de la subunidad catalítica y reguladora de la GCS. Se determinó asimismo la unión de factores de transcripción a los promotores de la subunidad catalítica y de la subunidad reguladora utilizando sólo los grupos 1, 3 y 5.

Se estudió también la fosforilación de las tres familias más importantes de las MAP quinasas en el páncreas en todos los grupos experimentales.

2.1.2.2. Grupos de estudio para conocer el efecto del tratamiento con oxipurinol y pentoxifilina sobre la activación de las MAP quinasas.

Se empleó 5 grupos experimentales para el estudio de los efectos de la inhibición de la actividad de la xantina oxidasa mediante el uso de oxipurinol, y de la inhibición de la producción de $\text{TNF-}\alpha$ mediante la pentoxifilina. Se utilizó 3 animales por grupo. Los animales se sacrificaron a los 30 min de la inducción de pancreatitis aguda necrótica.

- ❑ Grupo 1: Animales anestesiados y sacrificados que serán utilizados como control.
- ❑ Grupo 2: pancreatitis aguda necrótica + suero fisiológico.
- ❑ Grupo 3: pancreatitis aguda necrótica + oxipurinol.
- ❑ Grupo 4: pancreatitis aguda necrótica + pentoxifilina.
- ❑ Grupo 5: pancreatitis aguda necrótica + oxipurinol + pentoxifilina.

2.2. Modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína.

2.2.1. Descripción del modelo.

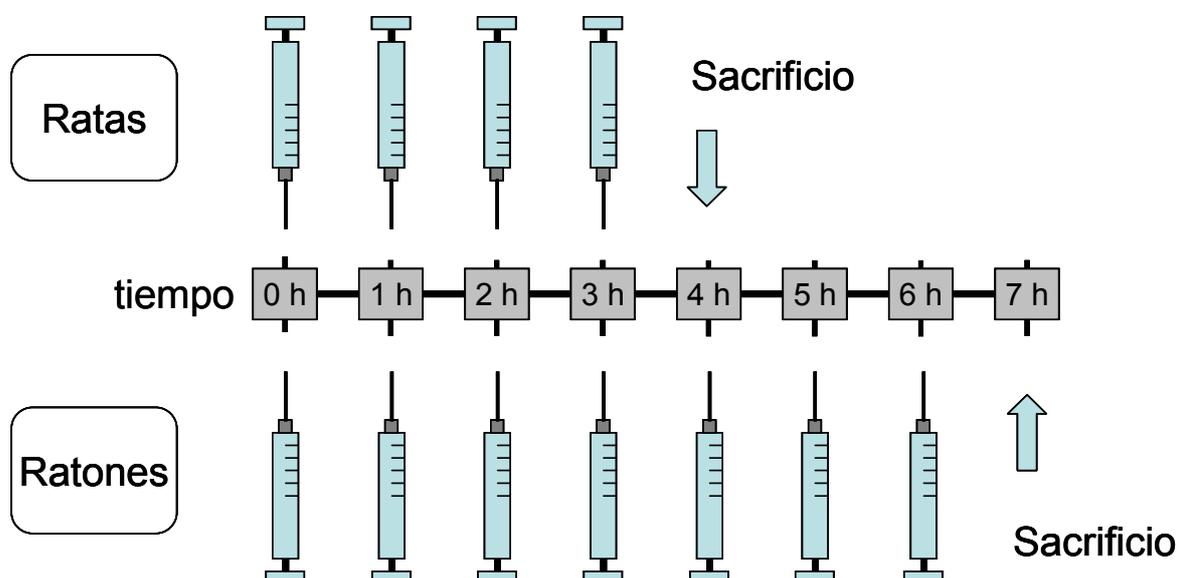
El estudio para la comparación de la expresión de la GCS con el modelo de pancreatitis aguda inducida con taurocolato se llevó a cabo utilizando un modelo en ratas de pancreatitis inducida por dosis supramáximas de un análogo de la colecistoquinina, la ceruleína. La pancreatitis inducida por ceruleína es reversible y sin mortalidad, asemejándose a la pancreatitis leve que ocurre en los humanos.

El modelo en ratas utilizado consta de 4 pinchazos intraperitoneales a intervalos horarios de una solución de ceruleína en cloruro sódico al 0,9%. La dosis de cada pinchazo fue de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, de forma que se administró un total de 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a cada rata.

Para el estudio con ratones deficientes de receptores de $\text{TNF-}\alpha$ y del propio $\text{TNF-}\alpha$ se utilizó el mismo modelo con pequeñas modificaciones. Se realizaron 7 pinchazos intraperitoneales a intervalos horarios con una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso por cada pinchazo. Esta forma necro-hemorrágica de pancreatitis con ceruleína en ratones es más severa que el modelo de ceruleína en ratas, que se considera edematoso.

Para optimizar el proceso, se prepara una solución stock de 1 microgramo de ceruleína por microlitro de solución fisiológica. Esta solución *stock* se puede congelar para usar posteriormente. De esta solución *stock* se prepara una solución de trabajo que se debe preparar fresca en cada pinchazo con concentraciones cómodas de manejo.

Figura 23.- Esquema de la inducción de pancreatitis con ceruleína.



Se sacrifica el animal una hora después del último pinchazo (figura 23). El sacrificio de los ratones se realiza por dislocación cervical y se procede a extraer el páncreas rápidamente. En el caso de las ratas, el sacrificio se realiza tras anestesia al animal, tal y como se describe en el apartado 1.1.

2.2.2. Diseño del estudio de la pancreatitis aguda inducida con ceruleína.

2.2.2.1. Grupos de estudio con ratas para conocer la regulación génica y expresión de la GCS.

Se estudiaron los niveles de glutatión en ratas inducidas con ceruleína. Se investigó la unión de factores de transcripción a la subunidad catalítica de la GCS, y mediante qRT-PCR se estudió la expresión de la enzima. Para ello se realizaron dos grupos experimentales:

- ❑ Grupo 1: ratas tratadas con salino.
- ❑ Grupo 2: ratas tratadas con ceruleína.

Se emplearon 3 animales de cada grupo y tras su sacrificio, se procedió a congelar el páncreas mediante la técnica del *freeze-clamp* almacenando el tejido hasta su utilización a -80 °C.

2.2.2.2. Grupos de estudio con ratones deficientes en el receptor 1 del TNF- α o en el receptor 2 del TNF- α .

Se ha comparado el glutatión pancreático de ratones *wild type* con el glutatión del páncreas de ratones deficientes en los receptores del TNF- α tras la administración de salino o de ceruleína. Por tanto, los grupos experimentales fueron:

- ❑ Grupo 1: ratones *wild type* tratados con salino.
- ❑ Grupo 2: ratones deficientes en el receptor 1 del TNF- α tratados con salino.
- ❑ Grupo 3: ratones deficientes en el receptor 2 del TNF- α tratados con salino.
- ❑ Grupo 4: ratones *wild type* tratados con ceruleína.

- ❑ Grupo 5: ratones deficientes en el receptor 1 del TNF- α tratados con ceruleína.
- ❑ Grupo 6: ratones deficientes en el receptor 2 del TNF- α tratados con ceruleína.

Se emplearon de 3 a 6 animales por grupo congelando el páncreas mediante *freeze-clamp* tras el sacrificio a -80 °C.

2.2.2.3. Grupos de estudio con ratones deficientes en TNF- α .

El estudio es similar al anterior pero se han utilizado ratones deficientes en el TNF- α . Los grupos fueron los siguientes:

- ❑ Grupo 1: ratones *wild type* tratados con salino.
- ❑ Grupo 2: ratones deficientes en TNF- α tratados con salino.
- ❑ Grupo 3: ratones *wild type* tratados con ceruleína.
- ❑ Grupo 4: ratones deficientes en TNF- α tratados con ceruleína.

Se han utilizado de 3 a 6 ratones por grupo y tras su sacrificio, se procedió a congelar el páncreas mediante la técnica del *freeze-clamping* almacenando el tejido hasta su utilización a -80 °C.

2.3. Aislamiento y cultivo de células acinares de páncreas de rata.

2.3.1. Fundamento.

La obtención de acinos pancreáticos frescos se realiza mediante una digestión del páncreas con colagenasa y agitación vigorosa. Tras la digestión del tejido, se realizan lavados para eliminar la colagenasa y por último se cultivan los acinos aislados en placas petri con un medio adecuado en la estufa de cultivos. Los acinos pancreáticos comienzan a desdiferenciarse perdiendo su capacidad de secreción de enzimas y su morfología característica con rapidez. Los experimentos se deben realizar el mismo día del aislamiento. Para que la digestión sea correcta se ha de extraer el páncreas de ratas jóvenes macho de aproximadamente 8 semanas.

2.3.2. Reactivos.

2.3.2.1. Tampón de digestión:

Se trata de un tampón complejo que contiene las sales y los nutrientes necesarios para evitar la muerte de los acinos pancreáticos y a la vez permita la lisis de las uniones interacinarias con colagenasa. Cabe destacar la inclusión de inhibidor de tripsina, de gran importancia puesto que puede haber liberación y activación de la misma al medio. La composición del tampón es la siguiente:

<input type="checkbox"/> NaCl:	110 mM
<input type="checkbox"/> KCl:	5,5 mM
<input type="checkbox"/> NaH ₂ PO ₄ :	2 mM
<input type="checkbox"/> Piruvato:	4 mM
<input type="checkbox"/> Fumarato:	4 mM
<input type="checkbox"/> Glutamato:	12 mM
<input type="checkbox"/> Glucosa:	12 mM
<input type="checkbox"/> CaCl ₂ :	1 mM
<input type="checkbox"/> MgCl ₂ :	1 mM
<input type="checkbox"/> Inhibidor de tripsina:	0,01 %
<input type="checkbox"/> HEPES:	25 mM
<input type="checkbox"/> Glutamina:	0,05 %
<input type="checkbox"/> Albúmina de suero bovino:	0,2 %
<input type="checkbox"/> Composición de aminoácidos (1X): preparada a partir de <i>BME aminoacids solution 50x</i> (Sigma ref. B-6766)	
<input type="checkbox"/> Composición de vitaminas (1X): preparada a partir de <i>BME vitamins solution 100x</i> (Sigma ref. B-6891)	
<input type="checkbox"/> Colagenasa 100 unidades/ml	

Se preparan también dos tampones iguales al anterior, pero ambos sin colagenasa. Uno con albúmina de suero bovino al 0,2%, y otro con Albúmina de suero bovino al 4%. Estos tampones ricos en albúmina nos permitirán eliminar la colagenasa del medio para el cultivo posterior.

2.3.2.2. Medio de cultivo:

Se prepara en campana de flujo laminar añadiendo antibióticos al medio comercial *199 medium* (Gibco, Invitrogen)

2.3.3. Procedimiento.

Tras el sacrificio del animal, se coloca apoyado sobre su lado derecho para que nos ofrezca el izquierdo. Tras empapar el pelo con alcohol al 70%, se realiza laparotomía para extracción del páncreas. Primero se localizan las uniones al estómago y al duodeno, separándolas con ayuda de dos pinzas. Después se localiza el bazo y estirando de él, se acaba de extraer todo el páncreas. Rápidamente se coloca sobre una placa petri rellena de parafina que nos servirá de soporte. Se evita la deshidratación añadiendo 5 ml de la solución de digestión. Se desecha la grasa y el mesentérico, así como posibles nódulos linfáticos. Se extiende y mediante agujas se pincha para fijarlo, de manera que quede en forma de lámina estirada. Se recogen los 5 ml de la solución de digestión con una jeringa y con ayuda de una aguja doblada se inyecta la solución de digestión dentro del páncreas. Se repite el procedimiento hasta que todo el páncreas esté uniformemente hinchado, reciclando siempre el líquido a inyectar.

Posteriormente se trocea el páncreas y se coloca en un erlenmeyer recogiendo todo el líquido posible. Tras saturar con oxígeno, se cierra el erlenmeyer con tapón de goma y se coloca en un baño a 37 grados agitando a máxima potencia. Pasados 15 min se procede al cambio de medio, decantando el medio utilizado y añadiendo 5 ml de solución de digestión nueva. Se repite la agitación saturando siempre con oxígeno antes. Al final de los 15 min se cambia el medio una vez más para hacer un total de tres agitaciones de 15 min. Por último, se agita a mano durante 5 min vigorosamente. Si el páncreas no está bien digerido se debe realizar un nuevo cambio de medio y dejar 15 min más agitando.

Tras la digestión con la colagenasa, se aspira la suspensión de los acinos pancreáticos usando dos pipetas de vidrio de 10 ml, primero una con pequeño orificio de salida y luego otra con orificio de salida más pequeño aún. Se debe retirar todas aquellas partículas que no son capaces de atravesar los orificios de las pipetas puesto que serán restos no digeridos, grasa o restos de vasos sanguíneos, etc.

Una vez concluida la separación de partículas sin digerir, finaliza el tratamiento con colagenasa y se debe proceder a la eliminación de la misma realizando lavados con alta concentración de albúmina de suero bovino. Para ello, se recoge con pipeta pasteur el medio con el páncreas digerido y se añade lentamente a un tubo que tenga 5 ml de la solución de albúmina de suero bovino al 4%. Puesto que el páncreas está digerido en otros 5 ml aproximadamente, el

volumen total será de 10 ml y entonces la concentración final de BSA es de 2% aproximadamente. Se centrifuga el tubo a 1000 r.p.m. durante 5 segundos para que precipiten los acinos y se retira el sobrenadante. El precipitado se resuspende con pipeta pasteur añadiendo 1 ml de solución de BSA sin colagenasa de un segundo tubo que contiene 5 ml de BSA al 4% y 5 ml de BSA al 0,2% ambos sin colagenasa. La resuspensión de acinos se añade lentamente a este segundo tubo. Tras otra centrifugación de 1000 r.p.m. durante 5 segundos se retira el sobrenadante y el precipitado se vuelve a resuspender con 1 ml de un último tubo que contiene 5 ml de BSA al 4%. Se añade la resuspensión de acinos a este último tubo lentamente realizando así el tercer lavado. Se centrifuga de la misma manera y el precipitado se resuspende con el medio de cultivo *199 medium* (Gibco, Invitrogen), adicionando una solución de penicilina y estreptomocina con 10000 unidades por mililitro de ambas, para conseguir una concentración final de 100 unidades de estreptomocina y 100 de penicilina para evitar la contaminación (Gibco, Invitrogen).

Tras centrifugar las células en el medio de cultivo a 1000 r.p.m. durante 5 segundos se retira el sobrenadante y se añade la cantidad deseada de medio de cultivo suplementado con antibióticos para realizar la siembra.

El medio de cultivo con los acinos pancreáticos se debe resuspender adecuadamente puesto que los acinos precipitan rápidamente. Para la siembra se utilizaron placas petri de 60 mm de diámetro que corresponden a un área aproximada de 21 cm² (Corning) y se añadieron 4 ml de suspensión de células acinares por cada placa. Para una correcta distribución de los acinos, se reparte la suspensión celular correspondiente a un páncreas en 4 placas de cultivo. Se preincuban las placas en la estufa a 37 °C y 5% de CO₂ durante una hora y media para la estabilización de los acinos, estando entonces ya listos para el experimento.

2.3.4. Diseño del estudio con células acinares de páncreas de rata.

El glutatión reducido se analizó en las células acinares como se detalla en el apartado 2.6., realizándose 5 condiciones experimentales, incubando las células en todos los casos durante 30 min.

- ❑ Condición 1: Células acinares pancreáticas control.
- ❑ Condición 2: Células acinares pancreáticas incubadas con taurocolato al 0,01%.
- ❑ Condición 3: Células acinares pancreáticas incubadas con taurocolato al 0,01% y PD 98059 (50 µM) como inhibidor de la vía de ERK.

- ❑ Condición 4: Células acinares pancreáticas incubadas con taurocolato al 0,01% y SP 600125 (50 μ M) como inhibidor de la vía de JNK.
- ❑ Condición 5: Células acinares pancreáticas incubadas con taurocolato al 0,01% y el cóctel de inhibidores de proteasas para mamíferos (5 μ l/ml).

Cabe aclarar que los inhibidores se añaden 15 min antes de iniciar la incubación con el taurocolato y permanecen en el medio de cultivo junto con él. Una vez finalizada la incubación, se decanta el medio de cultivo y tras un lavado con 2 ml de PBS, se añade 250 μ l de PCA al 6% con EDTA 1 mM. Se despegan las células con un rascador *cell scraper* (Corning, New York, USA) y se centrifuga a 15000 g durante 15 min para obtener un sobrenadante donde se medirá el GSH y un precipitado que se resuspenderá con NaOH 1M para medir las proteínas utilizando el mismo volumen que tenía de sobrenadante.

Además se estudió la activación de ERK y JNK durante el proceso de aislamiento de células acinares mediante técnicas de *western blot*.

2.4. Cultivos celulares de células AR42J.

2.4.1. Fundamento.

En nuestro estudio, empleamos la línea celular AR42J, proveniente de células de tumor pancreático exocrino de rata. Al provenir de células acinares, su organización y su capacidad de secreción se asemeja a los acinos que forman el páncreas exocrino de una rata. Es la línea celular que más se acerca *in vitro* a las células acinares del páncreas exocrino *in vivo*.

2.4.2. Condiciones de cultivo.

Las células AR42J se cultivaron según indicaciones de la *AMERICAN TYPE CELL CULTURE* (ATCC).

Se prepara el medio de cultivo en condiciones de esterilidad. Su composición es la siguiente:

- ❑ Dulbecco's Modified Eagle Medium con glutamina (GIBCO Lab. USA), pH 7.4
- ❑ Suero bovino fetal 10%
- ❑ Estreptomicina 100 μ g/ml

- ❑ Penicilina 100 µg/ml
- ❑ Fungizona 25 µg/ml

Para un frasco de cultivo de 75 cm² (T75) se prepara un volumen total de 15 ml. Estos frascos son idóneos para el mantenimiento y la producción de las células en gran número.

Una vez preparado el medio de cultivo, se añaden las células en número deseado y se introduce la mezcla en el frasco de cultivo adecuado. Los frascos se incuban a 37 °C en una estufa incubadora bajo una atmósfera con 5 % de CO₂.

El medio de cultivo se renovó de dos a tres veces por semana para las células de mantenimiento, y al proceder a realizar el experimento, el medio de cultivo se cambió aproximadamente 12 h antes.

2.4.3. Procedimiento.

Las placas empleadas para la realización de incubaciones con el fin de determinar los niveles de glutatión reducido, fueron placas petri de 21 cm² (Corning, New York). Se prepara un volumen total de 4 ml por placa y se siembran 500 000 células en total.

Se dejaron crecer las células sembradas hasta alcanzar un 80% - 90% de confluencia, que corresponde a unos 4 días tras la siembra, cambiando el medio 12 h antes del experimento como se ha indicado anteriormente. Se procedía a la incubación de las células según las diferentes condiciones experimentales que se detallan en el siguiente apartado. Tras el periodo de incubación, las placas se lavan con 1 ml de PBS en frío, y retirando con precaución el PBS, se añaden 250 µl de PCA al 6% EDTA 1mM. Se despegan las células con un rascador *cell scraper* (CORNING, New York, USA) y se recogen junto con el medio ácido en un tubo de 1,5 ml. Rápidamente, manteniendo a 4 °C, se centrifuga durante 15 min a 15000 g.

Se recoge y se mide el sobrenadante, donde se encuentra disuelto el GSH. Se determina el contenido en glutatión del sobrenadante como se indica en el apartado 2.6. utilizando 75 µl de muestra. El precipitado se redisuelve en NaOH 1M calentando durante varias horas a 45 °C utilizando el mismo volumen de sosa como de sobrenadante se obtuvo tras la centrifugación. Se mide la cantidad de proteínas en el precipitado redisuelto en NaOH utilizando una cantidad de 25 µl como se indica en el apartado 2.5.

2.4.4. Diseño del estudio con células AR42J.

Primero se comprobó el nivel intracelular de glutatión tras la descongelación de las células y los sucesivos pases, para poder llevar a cabo los demás experimentos. Todas las condiciones se realizaron por duplicado en cada experimento y al menos se realizaron tres experimentos diferentes de cada condición.

2.4.4.1. Incubaciones para conocer el efecto del taurocolato sobre el nivel de glutatión en células AR42J.

Se realizaron estudios de “*dosis-respuesta*” y “*time-course*” para conocer el efecto del taurocolato sobre el glutatión intracelular en células AR42J. Para ello, se ensayaron diferentes concentraciones de taurocolato, desde 0,1 % hasta 0,8 % y diferentes tiempos de incubación, desde 15 min hasta 2 h, para encontrar una dosis y un tiempo de incubación adecuados que pudiesen producir una depleción de glutatión importante. Se empleó junto con el taurocolato, en otra serie de experimentos, concentraciones crecientes de glutatión monoetil éster (5 mM, 10 mM y 20 mM) para observar el efecto de la reposición de los niveles de glutatión en estas células.

2.4.4.2. Incubaciones para conocer el efecto de la inhibición de las MAP quinasas sobre el nivel de glutatión tras la incubación con taurocolato en células AR42J.

Las células se preincubaron 15 min antes de la adición de taurocolato con inhibidores específicos de MAP quinasas, utilizando para la inhibición de ERK PD 98059 (100 μ M) que inhibe a MEK 1/2 que fosforila a ERK, así como el péptido inhibidor (20 μ M) que bloquea directamente a ERK. Para la inhibición de JNK se ha utilizado SP 600125 (100 μ M) y para la inhibición de p38 SB 203580 (100 μ M). Se realizaron dos incubaciones más combinando por un lado el inhibidor PD 98059 con actinomicina D (5 μ g/ml) para comprobar si los efectos observados se debían a la síntesis de nuevas proteínas y por otro, combinando el inhibidor PD 98059 con SP 600125.

2.4.4.3. Incubaciones para conocer los efectos de la inhibición de las proteasas sobre el nivel de glutatión tras la incubación con taurocolato en células AR42J.

Las células se preincubaron 15 min antes de la adición de taurocolato con inhibidores específicos de proteasas, como son la aprotinina (0,4 mM), la

pepstatina A (7,5 mM disuelta en DMSO con un 10% de ácido acético), la leupeptina (11 mM), la bestatina (20 mM), el E64 (7 mM) y el AEBSF (0,5 mM disuelto en DMSO). Se emplearon tanto formando un cóctel todos juntos como individualmente. La monensina (10 μ M en etanol), que es un ionóforo que neutraliza el pH ácido necesario para el correcto funcionamiento de las proteasas lisosomales, y la 3-metiladenina (5mM), que es un inhibidor de la autofagia celular, se emplearon como inhibidores de proteasas lisosomales.

2.4.4.4. Incubaciones para conocer el papel del calcio, del proteasoma y de la GGT en la depleción de glutatión tras la incubación con taurocolato en células AR42J.

Como quelante de calcio se ha utilizado el agente permeable BAPTA-AM (50 μ M). Se empleó la lactacistina (10 μ M) como inhibidor específico del proteasoma. Las células se preincubaron 15 min antes de la adición de taurocolato con los inhibidores utilizados excepto para el BAPTA-AM con el que se utilizó 40 min de preincubación para deplecionar de calcio a la célula. Como inhibidor de la GGT se utilizó acivicina (0,25 mM).

2.5. Determinación de proteínas.

2.5.1. Fundamento.

Empleamos el “*Protein Assay Kit*” de Sigma-Aldrich Química, basado en una modificación del método de Lowry (Lowry y cols., 1951). El reactivo de Lowry, incluido en el kit, contiene dodecilsulfato sódico, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles, y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas. El reactivo de Folin, también incluido en el kit, contiene fenol, que al interaccionar con el tartrato da lugar a un compuesto de color azul.

2.5.2. Procedimiento.

Se añadió una cantidad de muestra comprendida entre 5 y 25 μ l y se completó con agua hasta 1 ml. Para la correcta determinación de proteínas, se prepara una recta patrón construida con seroalbúmina bovina en concentraciones comprendidas entre 0,01 y 0,1 mg/ml, añadiendo el mismo volumen que el de muestra y completando con agua de la misma forma. Por último se prepara un blanco con 1 ml de agua.

Se añade 1 ml del reactivo de Lowry a cada tubo, se agita en el vórtex y después se incuba 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 500 μ L del reactivo de Folin, y tras agitar en el vórtex, se incuba 30 min en oscuridad.

La lectura espectrofotométrica se realiza a 660 nm de longitud de onda.

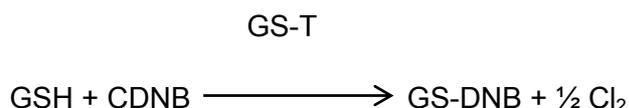
2.5.3. Cálculos.

Se resta a cada muestra la absorbancia del blanco. Las absorbancias obtenidas se interpolan con la recta construida con los patrones. El valor hallado se expresa como miligramos de proteína por mililitro de muestra.

2.6. Determinación de glutatión reducido.

2.6.1. Fundamento.

Para medir el glutatión reducido se ha utilizado el método descrito por Brigelius (Brigelius y cols., 1983). Se basa en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro-2,4-dinitrobenceno. Esta reacción está catalizada por la glutatión-S-transferasa. El aducto formado, 2,4-dinitrofenil-S-glutatión, presenta un máximo de absorción a 340 nm. Se mide a punto final, cuando la absorbancia se estabiliza.



2.6.2. Procedimiento.

En una microcubeta se añaden los siguientes reactivos:

- 25-100 μ l de muestra en PCA 6% EDTA 1 mM.
- 10 μ l de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno 10 mM en etanol al 100%.
- 750-825 μ l de tampón fosfato potásico 0,2 M, EDTA 1 mM, pH 7,0 para un volumen final de 860 μ l.

Se realiza rápidamente un autocero (ha de tenerse en cuenta que la absorbancia de la línea de base debe ser estable) (E1) y la reacción comienza añadiendo 10 μl de una solución de glutatión-S-transferasa 500 U/ml en tampón fosfato sódico 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,4. Esta solución se dializa previamente durante 6 h en tampón fosfato cambiando el tampón de diálisis cada 2 h.

Se registra la variación de la absorbancia a 340 nm hasta el final de la reacción (E2). La diferencia E2-E1 es proporcional a la cantidad de GSH existente.

2.6.3. Cálculo.

Para calcular la concentración de GSH se utiliza el coeficiente de absorción molar del 2,4-dinitrofenil-S-glutatión a 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

$$[\text{GSH MUESTRA}] = \frac{(E2-E1)}{9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \times \frac{\text{vol. total (ml)}}{\text{vol. muestra (ml)}} \times \frac{1}{\text{mg prot/ml}} \times \frac{1000 \mu\text{M}}{1 \text{ mM}}$$

Los valores se expresan en nmoles/mg prot.

2.7. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa.

2.7.1. Fundamento.

La actividad lactato deshidrogenasa (LDH) se valora en el medio de cultivo que ha estado en contacto con las células. Se determinó como parámetro de necrosis celular.

Se utilizó la técnica de Hakala (descrita en Bergmeyer y Bernt, 1974), basada en la conversión de lactato en piruvato, según la reacción:



La reacción se desplaza hacia la derecha por la presencia en el medio de NAD⁺ y lactato en exceso, y se ve favorecida en medio alcalino para así neutralizar los protones que se forman. La actividad LDH se determina por el aumento de absorbancia a 340 nm y a una temperatura de 25° C.

2.7.2. Procedimiento.

La actividad LDH se determinó como la velocidad máxima ensayada a concentración saturante de lactato. La mezcla de ensayo contenía: 1,8 ml de tampón glicina 0,2 M, pH 10; 0,1 ml de lactato 0,5 M; 0,1 ml de NAD⁺ 20 mM. La reacción se desencadena por adición de 100 µl de muestra, registrando el aumento de absorbancia a 340 nm.

2.7.3. Cálculos.

La actividad se expresa en mU/ml, siendo 1 mU la cantidad de enzima que transforma 1 nmol de sustrato por minuto, a 25°C.

2.8. *Western Blot*.

2.8.1. Fundamento.

El *Western Blot* es una técnica compleja de Biología Molecular compleja que combina en sí varias técnicas para conseguir finalmente determinar la cantidad de una determinada proteína de una muestra problema. Las técnicas que se emplean son la electroforesis, la electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa y la detección de la proteína deseada por inmunoluminiscencia.

Electroforesis.

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico. Se ha empleado electroforesis en geles verticales con una matriz de poliacrilamida, que es el que se utiliza mayoritariamente para la separación de proteínas. Se realizó lo que se denomina “SDS PAGE” (electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico) en condiciones desnaturizantes. La combinación utilizada de reactivos para la desnaturización fue de un detergente

desnaturalizante (SDS) y un agente reductor (β -mercaptoetanol) que rompe los puentes disulfuro. La separación en estas condiciones se produce por el peso molecular de cada proteína.

Electrotransferencia.

Para la exposición de las proteínas una vez migradas en el gel de poliacrilamida a los anticuerpos para la detección de las proteínas, se realiza una electrotransferencia. Se trata de poner el gel migrado en contacto en toda su longitud con una membrana de nitrocelulosa y crear un campo eléctrico que empuje a las proteínas a salir del gel. Se quedan pues sobre la membrana y serán susceptibles de unirse a los anticuerpos específicos deseados.

Inmuno-quimioluminiscencia.

Tras la transferencia se baña la membrana en una solución de bloqueo para impedir las uniones inespecíficas de los anticuerpos, y a continuación se baña en la solución que contiene el anticuerpo primario, que se une específicamente a la proteína que se quiere determinar. Tras unos lavados se baña en anticuerpo secundario que se fija al primario y que porta unida una enzima, la HRP (peroxidasa de rábano). Por último y tras lavados, se incuba la membrana con peróxido de hidrogeno conjuntamente con un agente comercial denominado Lumiglo R. Ambos reaccionan con ayuda de la peroxidasa dando quimioluminiscencia que se puede medir. El anticuerpo secundario se une al primario, que a su vez se une a la proteína a determinar emitiendo luz.

2.8.2. Condiciones del gel y transferencia.

Se cargaron homogenados cargados de proteína (de 40 a 80 μ g) en geles discontinuos, con una zona de empaquetado (*staging*) de baja concentración de acrilamida y una zona de resolución (*running*) de alta concentración de acrilamida. El empaquetado tiene un porcentaje de acrilamida menor facilitando la entrada y la compactación de las muestras en el gel. La zona de resolución se compone de acrilamida al 12% (29:1 acrilamida:bisacrilamida) con un 0,1% de SDS y separa las proteínas por su peso molecular. El gel se somete a un campo eléctrico de voltaje constante de 100 voltios durante al menos 2 h en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3).

Una vez finalizado el desplazamiento electroforético el gel es transferido (*Western Blot*) a una membrana de nitrocelulosa (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA).

El proceso se desarrolla durante 1 h, a 4°C y una intensidad constante de 250 mA, en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

2.8.3. Visualización.

- 1.- Tras la transferencia las membranas se incuban 60 min a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo y TBS-T que se compone de 0,1% Tween-20 en 1XTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6).
- 2.- Se realizan 3 lavados de 5 min con 15 ml de TBS-T.
- 3.- Las membranas se incuban el tiempo que determina el anticuerpo primario empleado (tabla 3) con agitación orbital en tampón de anticuerpo (5% BSA, en TBS-T) y con la correspondiente dilución de trabajo para el anticuerpo primario utilizado (tabla 3)
- 4.- Se realizan 3 lavados de 5 min con 15 ml de TBS-T.
- 5.- Las membranas se incuban 60 min con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti-IgG de conejo preparado en burro, (Cell Signaling). El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo (1:2000).
- 6.- Se realizan 3 lavados de 5 min con 15 ml de TBS-T.
- 7.- La membrana se incuba 1 minuto con Lumiglo R y con peróxido de hidrógeno (Cell Signaling Technology, USA) e inmediatamente se expone a autorradiografía con films de fotografía (KODAK X-OMAT).

Tabla 3.- Descripción de los anticuerpos utilizados para *western blotting*.

Anticuerpo	Descripción	Casa comercial	Peso molecular	Fuente	Dilución
Anti p-p38 ^{MAPK}	Detecta p38 fosforilada en Tr180 y Tir182	Cell Signaling	~38 kDa	Conejo	1:1000
Anti p-p44/42 ^{MAPK}	Detecta p44/42 fosforilada en Tr202 y Tir204	Cell Signaling	~/42-44kDa	Conejo	1:1000
Anti p-JNK ^{MAPK}	Detecta JNK fosforilada en Tr183 y Tir185	Cell Signaling	~/46-54kDa	Conejo	1:1000
Anti GCS	Detecta la subunidad pesada (epitopo del aa 295 al 313)	Labvision	~73 kDa	Conejo	1:500

Figura 24.- Esquema de la técnica de *western blotting*.



2.8.4. Cuantificación de los resultados.

Las imágenes obtenidas fueron escaneadas y mediante el programa PrestoPage manager de EPSON, almacenadas en formato digital TIF para poder realizar la densitometría utilizando el software "TotalLab".

2.9. Aislamiento de RNA.

La extracción de RNA total de tejido pancreático se debe realizar utilizando *RNA later* (Ambion) cuya función es estabilizar el RNA. Se aíslan de 5 a 10 mg de tejido pancreático y se sumergen inmediatamente en 0.5 ml de solución *RNA Later*. La extracción total de RNA se lleva a cabo mediante el Kit *mini RNA total extraction* (Quiagen) según las indicaciones del fabricante. El RNA se eluye con 35 μ l de agua libre de RNAsas que provee el fabricante. Se aísla una alícuota para comprobar la integridad y cuantificar el RNA, el resto se congela a - 80 °C hasta su uso. La concentración de RNA se estima midiendo la absorbancia a 260 nm y su pureza con el ratio A_{260}/A_{280} . El RNA se considera puro cuando el ratio es cercano a 2.

2.10. Retrotranscripción-amplificación del RNA (RT-PCR)

2.10.1. Fundamento.

Para el estudio de la expresión de genes de interés, una vez extraído el RNA total se realiza una retrotranscripción para el paso del RNA a DNA. Posteriormente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se amplifica el DNA utilizando primers específicos.

2.10.2. Retrotranscripción del RNA total.

Alícuotas de 2 μ g fueron sometidas a retrotranscripción con la enzima Superscript II RNase H⁻ (Gibco) utilizando como cebador hexámeros aleatorios (*random hexamers*, Invitrogen) durante 50 min a 42°C. Para inactivar la enzima se incubó la muestra durante 15 min a 70°C.

2.10.3. Análisis del RNA total retrotranscrito por PCR cuantitativo.

Las reacciones de PCR cuantitativo en tiempo real de las muestras de cDNA se realizaron en un termociclador acoplado a fluorescencia *ABI GeneAmp 7000 Sequence Detection System*, (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) usando como agente fluorescente *Syber Green PCR Master Mix* (PE Applied Biosystems). Cada reacción se llevó a cabo por triplicado y las curvas de fusión se

construyeron, mediante el programa *Dissociation Curves software* (Applied Biosystems), para asegurar que sólo se amplifica un único producto de PCR. Como control de carga se analiza por PCR cuantitativo el gen 18S rRNA. Los oligonucleótidos utilizados para el gen a estudio se detallan en la tabla 5.

Tabla 4.- Condiciones de amplificación en la RT-PCR.

1 ciclo:	93 °C durante 10 seg.
40 ciclos:	60 °C durante 1 minuto 95 °C durante 30 seg.

Tabla 5.- Oligonucleótidos específicos utilizados para la RT-PCR.

Nombre	Oligonucleótidos up/down
GCS subunidad catalítica	5'-CAGGCTCTTTGCACGATAACTTC-3' 5'-TGCTCTGGCAGTGTGAATCC-3'
GCS subunidad reguladora	5'-CAGGAGTGGGTGCCACTGT-3' 5'-TTTGACTTGATGATTCCTCTGCTT-3'
18s rRNA	5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3' 5'-GATCCGAGGGCCTCACTAAC-3'

2.11. Inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP):

2.11.1. Fundamento.

El método de inmunoprecipitación de cromatina empleado es una adaptación del protocolo descrito por Wells y Farham (2001). Se basa en un conjunto de técnicas destinadas a detectar la unión de diferentes factores de transcripción a la cromatina en su estado natural dentro del núcleo. Primero se fija el tejido con formaldehído, produciendo uniones carbamida entre la cromatina y

los factores que en ese momento se encuentren unidos a la cromatina. Se aíslan los núcleos y se procede a sonicar el material nuclear. La sonicación trocea la cromatina en segmentos de DNA de tamaño similar (que conservan unidos los factores de transcripción por los enlaces carbamida). Se inmunoprecipitan mediante anticuerpos específicos los factores de transcripción que se quieren estudiar (arrastrando el DNA al que estén unidos), y utilizando posteriormente en reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos de los genes de interés, se detecta la presencia o no del gen en el inmunoprecipitado. Si la PCR detecta el gen a estudiar es porque existía unión del factor de transcripción correspondiente a dicho gen como resultado de la activación génica.

2.11.2. Procedimiento.

2.11.2.1. Preparación de núcleos en tejido pancreático de rata.

Para la obtención de tejido pancreático de rata se extrae quirúrgicamente exclusivamente la región de la cabeza del páncreas que posee un peso promedio de 0.5 g. Rápidamente se sumerge en 30 ml de PBS con 1% de formaldehído durante 10 min con rotación suave a temperatura ambiente. Puesto que un solo animal no aporta una cantidad suficiente de tejido, se han de utilizar tres páncreas de rata por cada punto experimental estudiado. La formación de enlaces carbamida que produce el formaldehído se detiene por adición de glicina a una concentración final de 0.125 M. Las muestras se lavan dos veces con 10 ml de PBS y se resuspenden en 10 ml de PBS suplementado con 2 μ l/ml de cóctel de inhibidores de proteasas de mamíferos y de fosfatasas I y II (Sigma). El tejido se disgrega en un homogeneizador de hélice (Potter Elvehjem) y la suspensión obtenida se filtra a través de una membrana de nylon de poro de 500 μ m a un tubo falcon y se centrifuga a 3000 rpm durante 5 min. Los sedimentos celulares son resuspendidos suavemente con pincel en tampón de lisis celular (HEPES 5mM, KCl 85 mM, NP40 0.5%, pH 8.0) suplementado con 2 μ l/ml de cóctel de inhibidores de proteasas de mamíferos y de fosfatasas I y II (Sigma) y se incuban en hielo durante 15 min. Se centrifugan posteriormente a 5000 rpm durante 5 min para recoger los núcleos y los precipitados nucleares se resuspenden en 3 ml de tampón de lisis nuclear (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS pH 8.1) y se almacenan a -20°C en alícuotas hasta su uso.

2.11.2.2. Fragmentación de la cromatina entrecruzada.

Para obtener los fragmentos de cromatina para la inmunoprecipitación, los núcleos lisados se someten a sonicación (Vibra-Cell VCX-500 sonicator). Cada muestra fue sonicada con 5 ciclos de 10 segundos a 38% de amplitud con una sonda de 3 mm, siendo mantenidas en hielo durante 2 min entre ciclos. Los parámetros de sonicación fueron previamente determinados en un experimento

similar para obtener tamaños de cromatina con un rango de distribución desde 400 pb a 800 pb. A continuación las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 10 min y transferidas a nuevos tubos hasta eliminar cualquier rastro de residuos celulares. Una alícuota de 50 μ l se separa y se procesa para extracción y cuantificación de DNA, mientras que otra alícuota de 5 μ l se separa para la medida directa de la cromatina por A_{260} . La muestra restante que contiene los fragmentos de cromatina solubles, se diluye 10 veces con tampón de dilución (SDS 0.01%, Tritón X-100 1.1%, EDTA 1.2 mM, NaCl 167 mM, 2 μ l/ml de cóctel de inhibidores de proteasas de mamíferos y de fosfatasa I y II (Sigma), Tris-HCl 16.7 mM, pH 8.0) y finalmente son congeladas.

2.11.2.3. Cuantificación del DNA.

La alícuota de 50 μ l de cromatina se lleva a 500 μ l con TE (EDTA 1mM, Tris-Cl 10 mM, pH 8), se le añade 40 μ l/ml de RNasa A y se incuba a 65 °C durante toda la noche o, como mínimo, 6 horas. Tras ello, se lleva la muestra a una concentración final de 1% en SDS y 100 μ g/ml de proteinasa K. La reacción se incuba a 37 °C durante 1 h. El DNA se extrae una vez con 500 μ l de fenol, otra con 500 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y una final con 500 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24/1). El DNA se precipita añadiendo 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volúmenes de acetato sódico 3M, pH 5,2 y se incuba a -20 °C durante toda la noche. Tras el lavado con etanol 70% y su secado, el DNA se resuspende en TE pH 8. El DNA correspondiente a cada fracción se disuelve en 400 μ l de tampón TE y su concentración se cuantifica en placa de 96 pocillos por *Pico Green DNA quantification Kit* (Molecular probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se construye una curva de referencia con concentraciones de 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 y 100 μ g en un volumen final de 100 μ l de λ DNA diluido en TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) en cada pocillo. Por otro lado, se añaden 100 μ l de muestra por triplicado en diluciones de 1/5, 1/25 y 1/125 en TE. Tras ello, 100 μ l del fluoróforo del *Pico Green* (diluido 1/1000 con el mismo tampón) se añaden a cada pocillo y se registra la medida de fluorescencia en un aparato Fujifilm FLA3000 utilizando el programa informático correspondiente *Image Gauge V3.12*. La longitud de excitación se fijó a 480 nm y la de emisión a 520 nm. La curva de referencia que relaciona la fluorescencia frente a la concentración de λ DNA se utilizó para calcular la concentración del DNA. La comparación entre las medidas de absorbancia a 260 nm (cromatina) y de Pico Green (DNA) indica que existe una relación aproximada de 1 unidad de absorbancia por cada 50 μ g de DNA.

2.11.2.4. Inmunoprecipitación de la cromatina.

Con el objeto de conocer la distribución de tamaños de los fragmentos de cromatina, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE (Tris. 0,1M, ácido bórico 0,1M, EDTA 2 mM, pH 8,3).

Una vez se ha determinado la concentración y el tamaño correcto del DNA en la cromatina entrecruzada, las muestras son descongeladas y aproximadamente 200 μg de DNA se utilizan para cada inmunoprecipitación.

Se prepara proteína A+G-sefarosa, que se forma al combinar con volúmenes iguales de proteína A-sefarosa y proteína G-sefarosa, y se bloquea con 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de λDNA sonificado, BSA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y tRNA 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para saturar sus sitios inespecíficos de unión. Con esta proteína A+G-sefarosa se realiza un bloqueo de los sobrenadantes que contienen los fragmentos de cromatina solubles obtenidos anteriormente. Para ello, las muestras se incuban a 4°C durante 4 h con agitación suave en una plataforma rotatoria y, posteriormente, se centrifugan a 12000 rpm durante 30 s para eliminar la fracción que se pudiera unir de forma inespecífica a la proteína A+G en las posteriores etapas de la inmunoprecipitación.

Los complejos de inmunoprecipitación son seleccionados mediante la adición a los sobrenadantes de 2 μg de los anticuerpos enumerados en la tabla 6.

Tabla 6.- Anticuerpos utilizados en los ensayos de ChIP.

Anticuerpo	Casa comercial	referencia	μg finales
NF κ B	Santa Cruz	(sc-109)	2
RNApol II	Santa Cruz	(sc-899)	2
α -SP1	Santa Cruz	(sc-59)	2
c-Myc	Santa Cruz	(sc-764)	2
c-Jun	Santa cruz	(sc-45)	2

Como control negativo de la inmunoprecipitación se procesa una alícuota se procesa en paralelo en ausencia de anticuerpo (No Ac), y el sobrenadante de dicha muestra constituye la fracción no-unida a la proteína A+G-sefarosa, denominada (fracción Input). Estas muestras se incuban durante toda la noche a 4°C en el sistema rotatorio.

Al día siguiente, tras la incubación con el anticuerpo, a todas las muestras se les añade 50 µl de proteína A+G-sefarosa, previamente bloqueada como se comentó anteriormente, y se incuba a 4 °C durante 4 h en rotación. Tras ello todas las muestras se centrifugan a 12000 rpm durante 1 min y se recoge el sedimento con las proteínas A+G-sefarosa que contiene la fracción anticuerpo-unido (en este paso se recoge el sobrenadante de la muestra NoAb que corresponde a la fracción Input). Se lava durante 5 min en rotación dos veces con 1 ml de tampón de lavado de baja salinidad (Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 150 mM, ácido deoxicólico 0.5 %, SDS 0.1%, NP-40 1%, EDTA 1mM), dos veces con tampón de alta salinidad (Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 500 mM, ácido deoxicólico 0.5 %, SDS 0.1%, NP-40 1%, EDTA 1mM), dos veces con tampón de LiCl (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 1mM, LiCl 250 mM, NP-40 1%, ácido deoxicólico 0.5 %) y finalmente dos veces con tampón TE pH 8 (Tris 10mM, EDTA 0.25 mM). La fracción de cromatina inmunoprecipitada unida a la proteína A+G-sefarosa fue recogida por tratamiento del inmunocomplejo-proteína A+G sefarosa con un tampón de elución preparado de forma extemporánea (NaHSO₃ 100 mM, SDS 1%). Los fragmentos de cromatina aislados con el anticuerpo se incuban a continuación a 65°C durante toda la noche para eliminar el entrecruzamiento entre los complejos proteicos y el DNA. Al día siguiente se digieren las muestras con proteinasa K 1µl/100µl durante 1 h y finalmente el DNA de las fracciones (Input, inmunoprecipitado (IP) y No ab) se purifica con el *PCR purification Kit* (Quiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El DNA se eluye con 60 µl de tampón de elución que provee el fabricante (Tris-HCl 15 mM, pH 8,5) y se almacena a -20 °C hasta su análisis por PCR.

2.11.2.5. Análisis por PCR del DNA inmunoprecipitado.

La amplificación por PCR se realiza, de acuerdo con las condiciones descritas en la tabla 7, en un volumen de reacción de 20 µl con 2 µl de molde de DNA, 50 pmol de cada oligonucleótido, MgCl₂ 2 mM, betaína 1,5 M y 1 U de Taq polimerasa en 1X de tampón de la Taq. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las PCR se representan en la tabla 8.

Tabla 7.- Condiciones de amplificación en el ChIP.

1 ciclo:	93 °C durante 4 min
35 ciclos:	93 °C durante 30 segundos T ^a específica para cada gen durante 30 segundos 72 °C durante 30 segundos
1 ciclo:	72 °C durante 7 min

Para el análisis de los productos de PCR, 5 µl de cada muestra se mezclan con 1 µl de tampón de carga 6X y se carga en un gel de agarosa del 1.8 %. El gel se migra en un tampón de TBE 0.5X durante el tiempo correspondiente, utilizando el patrón de pesos moleculares *P100 ladder* (Pharmacia Biotech). El gel se fotografía en un transiluminador de ultravioleta.

Tabla 8.- Oligonucleótidos específicos utilizados para los ensayos de ChIP.

Nombre	Oligonucleótidos up/down
promotor de la GCS catalítica:	5'-TGTAAGCATGAGGCTCCCTCC-3' 5'-TTCCTACTTGCGACCCAAGG-3'
promotor de la GCS reguladora:	5'- TCGACCAGTTTCAATTCTCTATCC-3' 5'-GAGTATTTGGGCTTCCTGACATT-3'

2.12. RNAPol-ChIP.

Se ha desarrollado en nuestro laboratorio un nuevo procedimiento variante del de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) (Sandoval y cols., 2004). La técnica RNAPol-ChIP es una nueva aproximación al análisis de la transcripción génica, que consiste en la detección de la presencia de la RNAPol II en la región

codificante de los genes a estudios, tanto en tejido como en cultivos celulares. El método utiliza la técnica ChIP con un anticuerpo frente a la RNAPol II, con la novedad de que el análisis por PCR semicuantitativo del inmunoprecipitado debe llevarse a cabo con oligonucleótidos que amplifican la región transcribible. Hay que tener en consideración que la región amplificada esté más de 1000 pb situado en la región 3' del inicio de transcripción con el objeto de evitar la inmunoselección de RNAPol II no elongante y pausada en el promotor de algunos genes a estudio. Esta técnica permite estimar la tasa de transcripción en tiempo real eliminando algunos de los inconvenientes de la detección de mRNA, como medida de expresión génica, por técnicas clásicas como RT-PCR o *Northern blot*.

Los oligonucleótidos utilizados en este apartado se enumeran en la tabla 9.

Tabla 9.- Oligonucleótidos específicos utilizados para los ensayos de RNAPol-ChIP.

Nombre	Oligonucleótidos up/downn
GCS catalítica:	5'-TGGATTCACACTGCCAGAGC -3'
intrón 1, entre 459 y 737 pb	5'-CACCTGAAGACAGCAGTTGC -3'
GCS reguladora:	5'- TCCAGGACAACCAGAGCGAC-3'
intrón 1, entre 1052 y 1236 pb	5'-AGTCTGGGTATTAGGAGTCCACC-3'

2.13. Estudios mediante microscopía confocal.

2.13.1. Fundamento.

La microscopía confocal se encuentra englobada dentro de la microscopía óptica, concretamente de la microscopía de fluorescencia. Se caracteriza por: 1) la utilización de una fuente de iluminación focalizada en un solo punto de la muestra, un láser; de manera que la imagen final de la muestra se obtiene tras sucesivos barridos de la misma. 2) La accesibilidad de la radiación emitida al fotodetector está limitada por un diafragma (pinhole), el cual permite la exclusión de la radiación emitida por los puntos de la muestra que no se encuentran en el plano focal. Además, la utilización de un software adecuado permite mejorar la

calidad de la imagen por disminución de la sensibilidad de los fotodetectores a intensidades bajas de fluorescencia, con lo que se reduce el ruido de fondo.

La combinación de la captación de imágenes en el plano focal con el software permite la utilización del microscopio confocal como un “microtomo óptico”, lo cual posibilita la obtención de secciones ópticas de la muestra, base para la obtención de imágenes en tres dimensiones.

La utilización de fluorocromos específicos vitales permite el estudio de células vivas obteniendo una información cuantitativa y de localización de las moléculas de interés, así como conocer el estado celular en que se encuentran la células. Para la detección de células que han perdido la integridad de la membrana y que por tanto se consideran muertas por necrosis, se empleó el fluorocromo yoduro de propidio (Sigma), que se intercala en el DNA (y también al RNA) sin apenas diferenciar entre nucleótidos, con una estequiometría de un fluorocromo por cada 4--5 pares de bases. Tiñe por tanto el núcleo aumentando su fluorescencia unas 20 veces una vez unido al DNA. Absorbe a 535 y emite a 617 nm. Para diferenciar las células vivas normales de las apoptóticas se ha empleado la anexina V conjugada con Alexa fluor 488 (Invitrogen) que le da una absorción de 495 y una emisión de 519. La anexina V tiene capacidad para unirse específicamente a la fosfatidil serina, un fosfolípido que en condiciones normales se encuentra en la cara interna de la membrana, pero que se externaliza cuando la célula entra en apoptosis (van Engeland y cols., 1998). La anexina no es capaz de atravesar la membrana cuando ésta mantiene su integridad, por lo que se detecta solamente la fosfatidil serina que se ha externalizado en las células apoptóticas. Si la célula pierde su integridad, la anexina V se une también a la fosfatidil serina que está en la cara interna de la membrana, por lo que se utiliza junto con el yoduro de propidio para diferenciar las células apoptóticas tempranas de aquellas necróticas con membrana permeable.

Por último, para la detección del glutatión mediante el microscopio confocal, se ha utilizado el fluorocromo monoclorobimano (Invitrogen). Este fluorocromo, que apenas tiene fluorescencia si no está unido al glutatión, se une específicamente al GSH por medio de la glutatión S transferasa presentando un máximo de absorción a 394 y un máximo de emisión a 490 (Fernandez-Checa y Kaplowitz, 1990).

2.13.2. Procedimiento y diseño del estudio.

2.13.2.1. Estudio de los niveles de glutatión en acinos pancreáticos.

Se realizaron estudios de microscopía confocal utilizando placas específicas denominadas Lab-Tek de 4 pocillos de 1,5 cm² (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Las células obtenidas de un páncreas de rata se resuspenden en 16 ml de medio de cultivo, y se añaden a cada pocillo 285 µl de dicha suspensión de las placas Lab-Tek. Como fluorocromo se utilizó el monoclorobimano 3 µM, preincubando 15 min antes de captar imágenes. El monoclorobimano se añade de una solución stock 50 mM en etanol absoluto. Las condiciones experimentales fueron:

- ❑ Acinos pancreáticos control.
- ❑ Acinos pancreáticos incubados con taurocolato 0,01% durante 30 min.
- ❑ Acinos pancreáticos incubados con taurocolato 0,01% durante 30 min y preincubados 15 min antes con PD 98059 como inhibidor de la vía de ERK.

Se captaron imágenes tomando diversos campos al azar y se cuantificó el plano de máxima fluorescencia de 100 células por condición en 3 experimentos diferentes.

2.13.2.2. Estudio de los niveles de glutatión y del tipo de mortalidad celular en células AR42J.

Las células AR42J se cultivaron según se detalla en el apartado 2.4. Se utilizaron placas de cultivo Lab-Tek (Nunc, Wiesbaden, Alemania) al igual que con los acinos pancreáticos. Para realizar el experimento con suficiente número de células, se siembran 35000 células en cada pocillo con 0,5 ml de medio de cultivo y se espera a obtener un porcentaje de confluencia de 80-90%, cambiando el medio el día anterior al experimento.

Para la preparación de los fluorocromos, se prepara una solución stock de yoduro de propidio en tampón fosfato a una concentración de 1 mg/ml. De esta solución se añade un microlitro para la tinción de las células en 0,5 ml de medio de cultivo. Para la tinción con anexina, se añaden 3,3 µl de *Annexin V Alexa Fluor 488*[®] (Molecular Probes – Invitrogen num. cat. A13201) por cada 100 µl de medio de cultivo.

Se han realizado tres condiciones experimentales con células AR42J, utilizando en ellas la anexina V, el yoduro de propidio y el monoclorobimano. Las condiciones son las siguientes:

- ❑ Control
- ❑ Incubación con taurocolato 0,5% incubado durante 1h.
- ❑ Incubación con taurocolato 0,5% 1h + inhibidor de proteasas AEBSF 0,5 mM

La obtención de imágenes se realizó en una atmósfera con 5% de CO₂ y una temperatura de 37 °C. Se añaden los fluorocromos 15 min antes de la captación de imágenes para una correcta tinción. Los inhibidores se añaden 15 min antes de la adición de taurocolato.

Se realizaron experimentos en placas de 21 cm² para obtener muestra del sobrenadante de las tres condiciones de estudio para medir la actividad LDH en el medio de cultivo como medida de mortalidad celular, y se estudió la cantidad de proteína que queda en placa tras la incubación con el taurocolato.

2.14. Análisis estadístico.

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar, con el número de experimentos representado entre paréntesis. El análisis estadístico se lleva a cabo en dos pasos. En primer lugar, la media de los diferentes grupos se compara utilizando el análisis de la varianza. Cuando la comparación global entre grupos es significativa, la diferencia entre grupos individuales se determina aplicando la prueba de Tukey, considerando que las diferencias son significativas para una $p < 0.05$ e indicando aquellos análisis que den como resultado una $p < 0,01$.

IV-RESULTADOS

1. EVOLUCIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN PÁNCREAS EN EL CURSO DE LA PANCREATITIS AGUDA NECRÓTICA.

Utilizando el método de Brigelius y cols. (Brigelius y cols., 1983) descrito anteriormente en el correspondiente apartado de material y métodos, hemos estudiado las variaciones de los niveles de glutatión reducido que sufre el páncreas con el tiempo tras la inducción de pancreatitis aguda experimental mediante perfusión retrógrada de taurocolato al 3,5%.

La figura 25 muestra los niveles de glutatión reducido (GSH) en homogenado de páncreas obtenido de ratas sacrificadas a 0.5, 1, 3, 6 y 9 h tras la inducción de pancreatitis aguda necrótica. El glutatión sufre una depleción marcada que puede apreciarse desde la media hora tras la inducción de pancreatitis. Los niveles de GCS disminuyen rápidamente desde $1,6 \pm 0,3$ $\mu\text{moles/g}$ de tejido en condiciones basales hasta $0,73 \pm 0,17$ $\mu\text{moles/g}$ de tejido y se mantienen bajos hasta al menos 9 h después de la inducción de la pancreatitis aguda experimental.

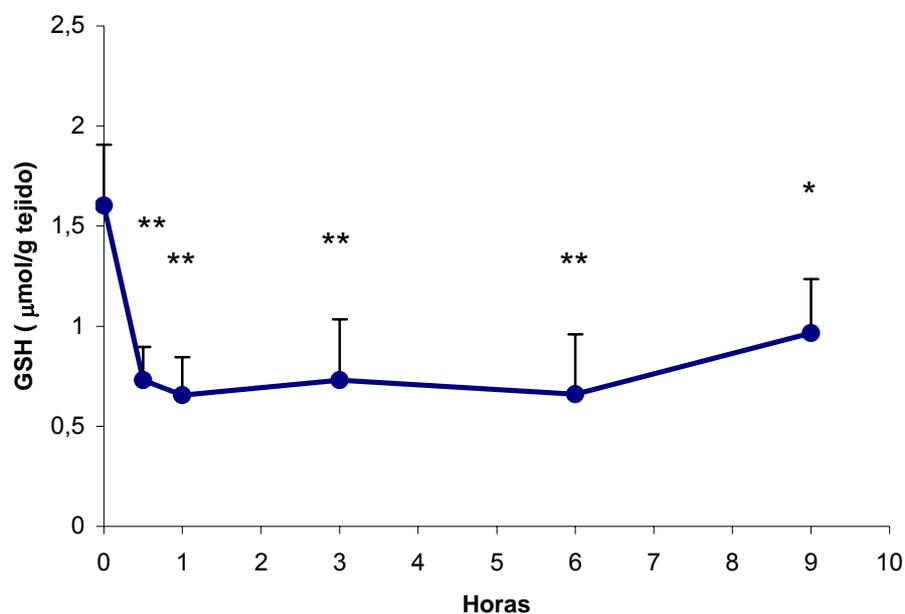


Figura 25.- Evolución de los niveles de glutatión reducido (GSH) en páncreas tras la inducción de pancreatitis aguda por taurocolato. El número de experimentos fue de 3 a 6 en cada punto. Las diferencias significativas se muestran como: *p<0,05 vs control, **p<0,01 vs control.

2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA γ -GLUTAMIL CISTEÍNA SINTETASA EN LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL NECRÓTICA.

2.1. Expresión de la γ -glutamyl cisteína sintetasa en la pancreatitis aguda necrótica.

La γ -glutamyl cisteína sintetasa (GCS), enzima limitante de la síntesis de glutatión, está formada por dos subunidades, una subunidad grande o catalítica y una subunidad pequeña o reguladora. Mediante RT-PCR cuantitativa determinamos los niveles de mRNA tanto de la subunidad reguladora como de la catalítica en la cabeza y en la cola del páncreas. La figura 26A muestra los niveles de mRNA mensajero en la cabeza y en la cola del páncreas de la subunidad catalítica de la GCS.

Como se observa en la figura, se produce un aumento de expresión tardío y no muy acusado sólo a las 6 h de inducción con respecto al control. La figura 26B y la figura 26C muestran la curva de fusión (que informa de la existencia de un único fragmento de PCR amplificado) y la variación de la fluorescencia frente al número de ciclos de amplificación en la RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).

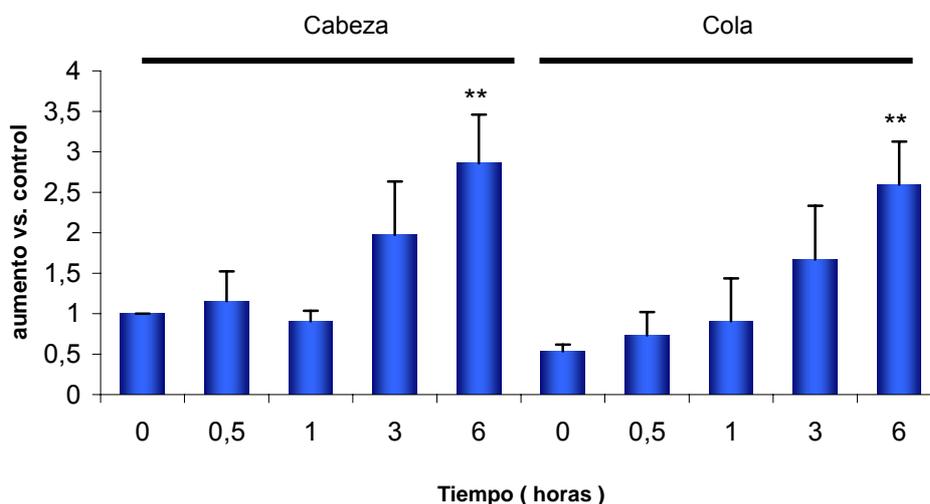


Figura 26A.- RT-PCR del gen de la subunidad catalítica de la γ -glutamyl cisteína sintetasa (GCS) en la cabeza y en la cola del páncreas. Los valores se expresan como número de aumentos de expresión con respecto a 0 h. El número de experimentos fue de 3. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ vs. 0 h.

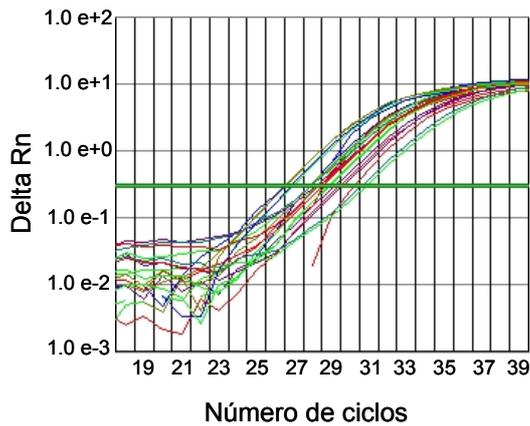


Figura 26B.- Variación de la fluorescencia frente al número de ciclos de amplificación de la RT-PCR de la GCS.

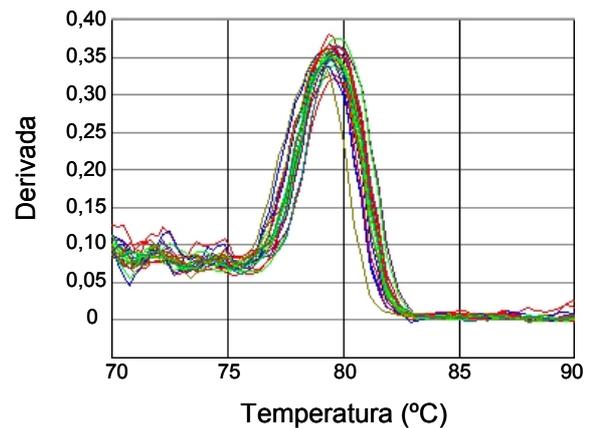


Figura 26C.- Curva de fusión de los fragmentos amplificados en la RT-PCR de la GCS.

La expresión de la subunidad reguladora, analizada medida mediante qRT-PCR, aumenta levemente y de forma tardía en la cabeza del páncreas a las 6 h tras inducción como ocurría con la subunidad catalítica de la GCS (figura 27A). En el caso de la cola del páncreas no se aprecian valores significativamente diferentes en ningún de los tiempos elegidos tras la inducción de la pancreatitis. En la figura 27B y en la figura 27C se muestra el punto de corte y la curva de fusión de la qRT-PCR.

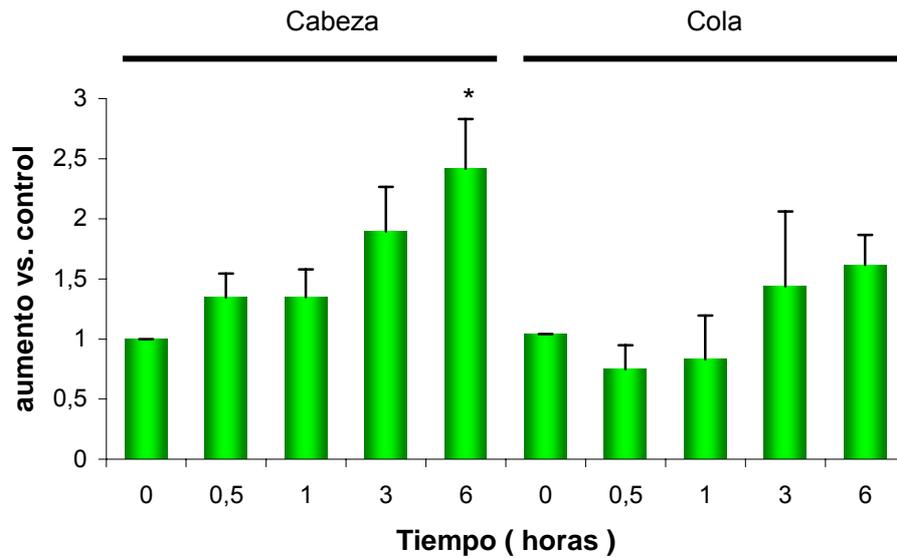


Figura 27A.- RT-PCR del gen de la subunidad reguladora de la GCS en la cabeza y la cola del páncreas. Los valores se expresan como número de aumentos de expresión con respecto al control. Las diferencias significativas se muestran como * $p < 0,01$ vs. control. El número de experimentos fue de 3.

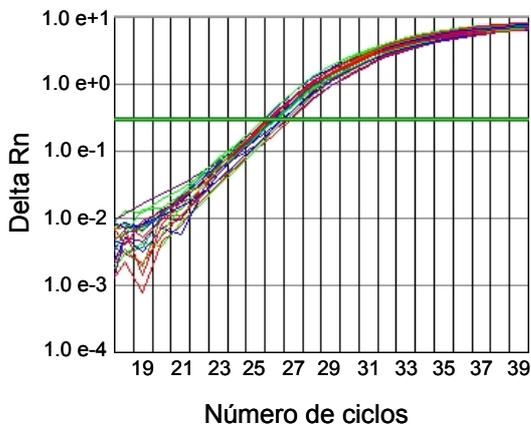


Figura 27B.- Variación de la fluorescencia frente al número de ciclos de amplificación de la RT-PCR de la GCS.

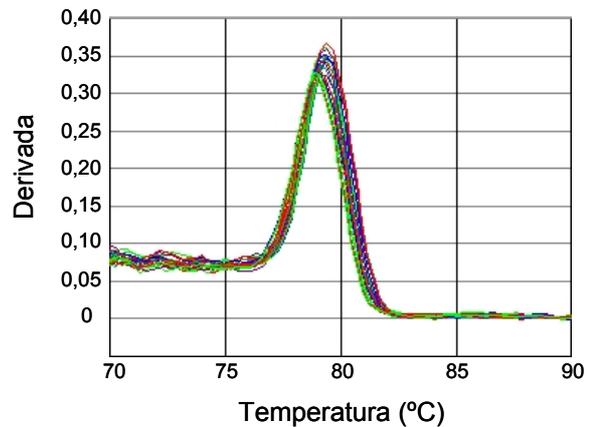


Figura 27C.- Curva de fusión de los fragmentos amplificados en la RT-PCR de la GCS.

2.2. Unión de la ARN polimerasa a la región codificante del gen de la γ -glutamil cisteína sintetasa en cabeza del páncreas en la pancreatitis aguda necrótica.

Utilizando la técnica de la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y anticuerpos específicos contra la ARN polimerasa II se puede detectar la actividad transcripcional en tiempo real mediante la unión de la misma a las regiones codificantes de los genes de interés. Para conocer las regiones en las que está unida la ARN polimerasa II se utilizan técnicas de PCR con primers específicos frente a dichas regiones. En la figura 28A podemos observar la unión de la ARN polimerasa II al intrón 1 de la subunidad catalítica de la GCS. La unión de la ARN polimerasa II al intrón 1 de la subunidad reguladora se presenta en la figura 28B. En ambos casos se observa un aumento de la unión de la enzima a este gen, con un máximo tras una hora de inducción de la pancreatitis aguda. Después, la unión de la ARN polimerasa II decrece hasta hacerse casi indetectable a las 6 h tras el inicio de la pancreatitis aguda.

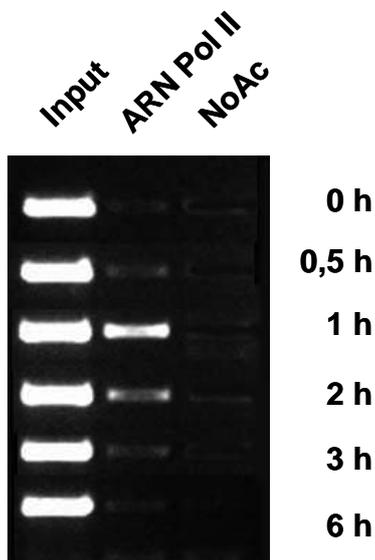


Figura 28A.- PCR con primers específicos del exón de la subunidad catalítica de la GCS de inmunoprecipitados obtenidos utilizando anticuerpos contra la ARN polimerasa II. Input indica PCRs de material nuclear sin inmunoprecipitar y No Ac indica PCRs del proceso de inmunoprecipitación sin utilizar ningún anticuerpo.

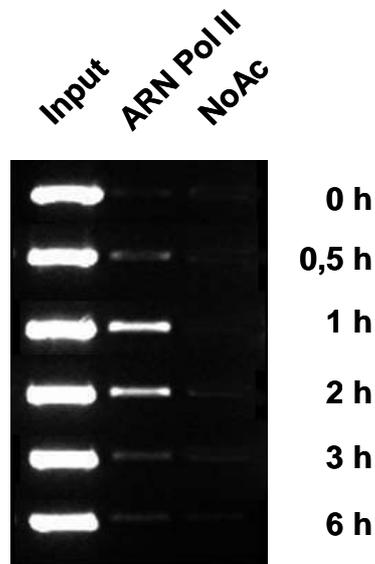


Figura 28B.- PCR con primers específicos del exón de la subunidad reguladora de la GCS de inmunoprecipitados obtenidos utilizando anticuerpos contra la ARN polimerasa II. Input indica PCRs de material nuclear sin inmuprecitar y No Ac indica las PCR del proceso de inmunoprecipitación sin utilizar ningún anticuerpo.

2.3. Unión de factores de transcripción a los promotores de la γ -glutamil cisteína sintetasa en la pancreatitis aguda necrótica.

La unión de factores de transcripción a los promotores de los genes de la GCS se analizó en el páncreas mediante la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina. En la figura 29A se puede muestra la unión de los factores de transcripción estudiados al promotor del gen de la subunidad catalítica en ratas controles, en ratas sacrificadas a 1 h y a las 6 h de la inducción de la pancreatitis aguda necrótica. En estos ensayos se han elegido anticuerpos frente a factores implicados en el desarrollo del proceso inflamatorio como NF- κ B, SP-1, c-Jun o c-Myc y la unión de la ARN Polimerasa en el promotor del gen. Como se observa en la figura, se produce una limitada unión a la hora tanto de NF- κ B como de c-Jun y c-Myc, más intensa de SP-1 y muy significativa e intensa de la ARN Pol II. A las 6 h se produce un aumento en la unión de c-Myc a la vez que se reduce la unión de la ARN Polimerasa II.

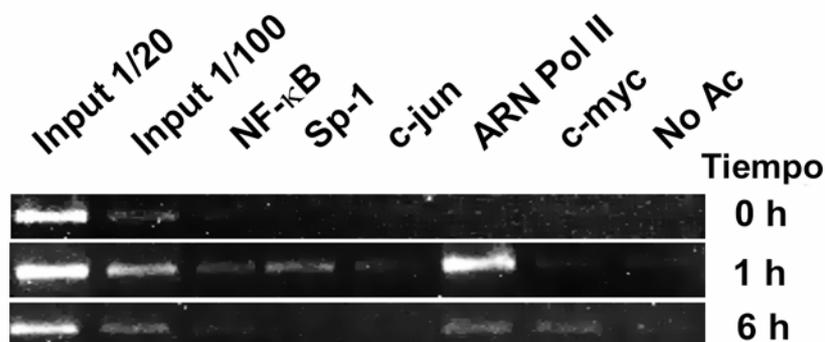


Figura 29A.- Unión de factores transcripcionales al promotor del gen de la subunidad catalítica de la GCS. Los carriles Input 1/20 y 1/100 son controles positivos a las diluciones expresadas y el carril no anticuerpo (No Ac) es un control negativo de la inmunoprecipitación.

Por su parte, la unión de los factores de transcripción al promotor de la subunidad reguladora se muestra en la figura 29B. Se observa una unión basal de NF- κ B, de c-Jun, de c-Myc y de la ARN Pol II en el promotor del gen, manteniéndose la unión de estos últimos complejos tras 1 h de inducción. A las 6 h se puede destacar la intensa unión del factor c-Myc y una unión menor de NF- κ B y de la ARN Pol II.

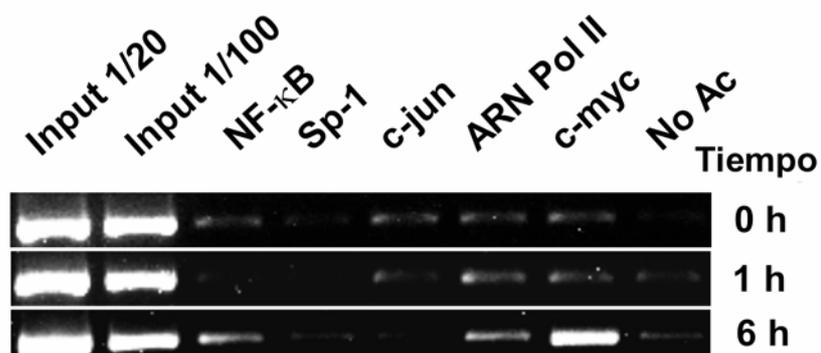


Figura 29B.- Unión de factores transcripcionales al promotor del gen de la subunidad reguladora de la GCS. Los carriles Input 1/20 y 1/100 son controles positivos a las diluciones expresadas y el carril no anticuerpo (No Ac) es un control negativo de la inmunoprecipitación.

2.4. Expresión de la proteína de la γ -glutamil cisteína sintetasa en páncreas en el curso de la pancreatitis aguda necrótica.

El *Western blot* de la subunidad catalítica de la GCS muestra pocos cambios en el nivel de la proteína en páncreas durante el desarrollo de la pancreatitis (figura 30A y 30B). Se puede observar tan solo una ligera disminución de alrededor de un 20% de la cantidad de GCS tras inducción de la pancreatitis con respecto al control. Esta tendencia no parece ser significativa en el desarrollo de la pancreatitis como se aprecia en la densitometría del *Western blot* que presenta la figura 30B.

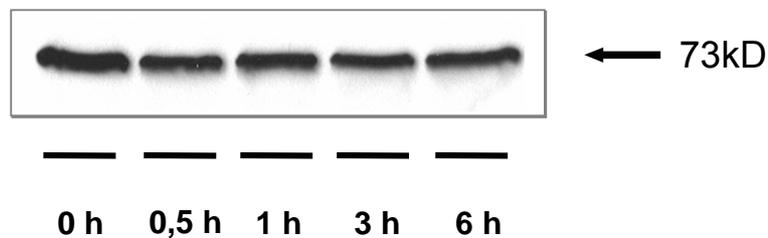


Figura 30A.- Niveles de la proteína GCS en páncreas durante la pancreatitis aguda. Se muestra un *Western blot* representativo de la subunidad catalítica de la GCS en páncreas tras 0, 0,5, 1, 3 y 6 h de inducción de la pancreatitis necrótica. Se ha utilizado un anticuerpo específico de la subunidad catalítica de la GCS cuyo tamaño se muestra a la derecha de la figura.

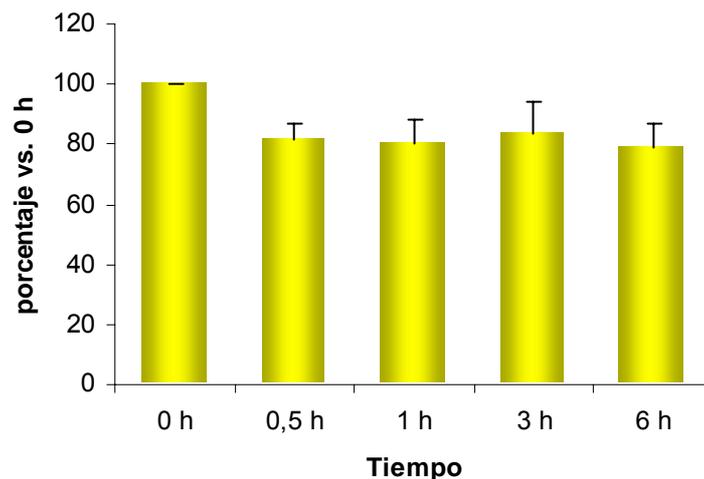


Figura 30B.- Densitometría de los *western blots* de la GCS. Las barras de error corresponden a la dispersión de tres experimentos independientes.

3. NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN PÁNCREAS EN LA PANCREATITIS AGUDA EDEMATOSA EN RATAS.

El estudio de los niveles de glutatión reducido en páncreas de ratas inducidas con ceruleína muestra una depleción severa como se puede observar en la figura 31. El GSH cae dramáticamente como sucede en la pancreatitis aguda experimental inducida con taurocolato, alcanzando el 16,5% del valor normal de GSH en ratas control.

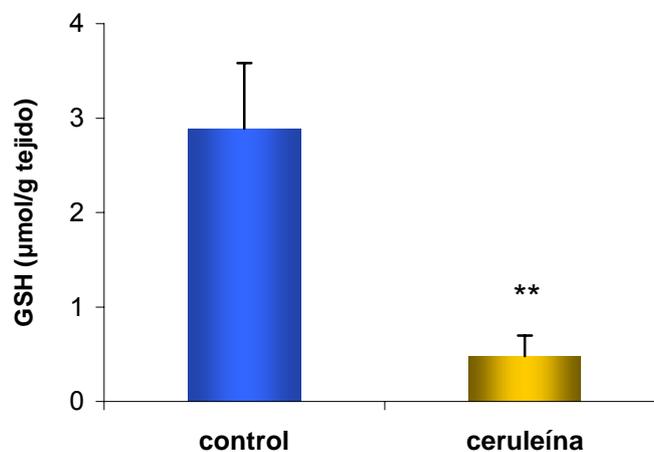


Figura 31.- Niveles de glutatión reducido (GSH) en páncreas tras la inducción de pancreatitis aguda por ceruleína en ratas. El número de experimentos fue de 3 a 6 en cada punto. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ vs. control.

4. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA γ -GLUTAMIL CISTEÍNA SINTETASA EN LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL EDEMATOSA.

4.1. Expresión de la γ -glutamil cisteína sintetasa en la pancreatitis aguda edematosa.

Mediante RT-PCR cuantitativa hemos determinado la expresión de la subunidad catalítica en páncreas de ratas control y con pancreatitis aguda inducida con ceruleína. Los valores sufren un marcado aumento en las ratas con pancreatitis aguda respecto a las ratas control, como se puede observar en la figura 32. En la pancreatitis aguda inducida con taurocolato se producía una expresión tardía y poco acusada (figura 26). Por tanto, en la pancreatitis edematosa la enzima se expresa de forma rápida y eficaz, mientras que en la pancreatitis necrótica no.

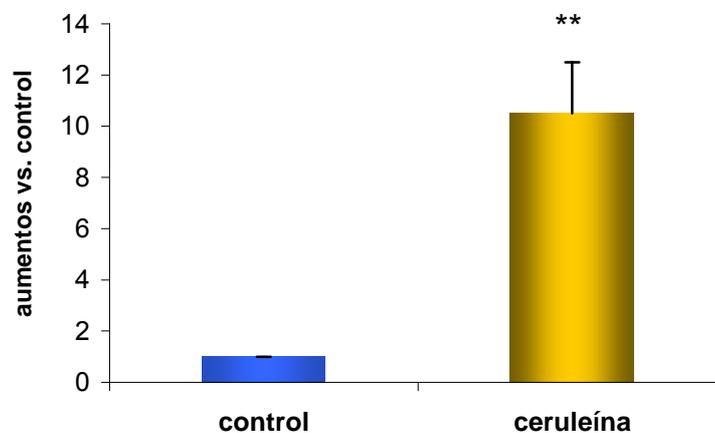


Figura 32.- RT-PCR del gen de la subunidad catalítica de la GCS en la cabeza del páncreas. Los valores se expresan como número de aumentos de expresión con respecto al control. (** $p < 0,01$ vs control). El número de experimentos fue de 3.

4.3. Unión de factores de transcripción al promotor de la subunidad catalítica de la γ -glutamil cisteína sintetasa.

Hemos estudiado, mediante la técnica de CHIP, la unión de los factores de transcripción NF- κ B, SP-1 y c-Myc al promotor de la GCS. Se produce unión de los tres factores de transcripción al promotor del gen en páncreas de ratas inducidas con ceruleína. Esta unión de factores de transcripción se ve acompañada por la presencia de la RNA pol II en el promotor como se puede observar en la figura 33.

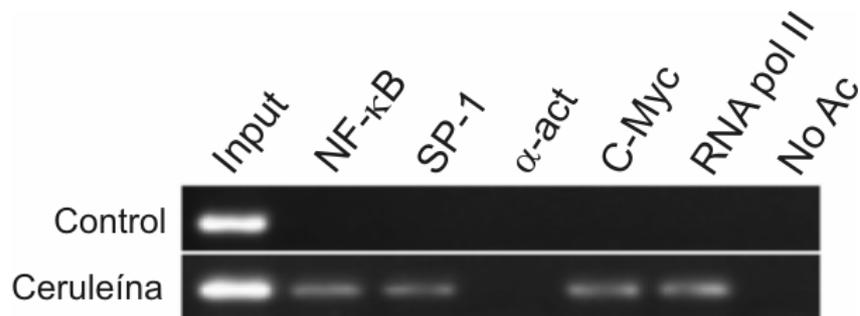


Figura 33.- Unión de factores transcripcionales al promotor del gen de la subunidad catalítica de la GCS. El carril Input es un control positivo y el carril no anticuerpo (NoAc) es un control negativo de la inmunoprecipitación.

5. FOSFORILACIÓN DE LAS MAP QUINASAS EN LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL NECRÓTICA.

5.1. Evolución de la fosforilación de ERK en páncreas durante la pancreatitis aguda necrótica.

La fosforilación de las MAP quinasas se ha medido como un índice de su activación mediante la técnica de *Western blot*, utilizando anticuerpos específicos que reconocen la forma bifosforilada de las MAP quinasas. En la figura 34A se presenta un gel representativo que muestra la fosforilación de ERK 1/2 en el páncreas durante la inducción de la pancreatitis aguda. Las figuras 34B y 34C presentan el valor medio de la densitometría de tres experimentos independientes al mostrado en la figura 34A, y las barras de error correspondientes, de la evolución de la fosforilación de ERK 1 y ERK 2 respectivamente. En ambos casos tanto ERK 1 como ERK2 presentan valores significativamente elevados entre 0.5 y 3 h de de la inducción de la pancreatitis aguda con taurocolato. En la figura 34C se presenta la densitometría de la banda de ERK 2, observándose una fosforilación similar. Se produce pues una fuerte fosforilación de ERK 1/2 tras la inducción de la pancreatitis aguda en el páncreas. Esta fosforilación es rápida, produciéndose un pico a la media hora de la inducción y progresivamente después un descenso en la fosforilación alcanzando valores próximos al control a las 6 h del desarrollo de la pancreatitis aguda inducida con taurocolato.

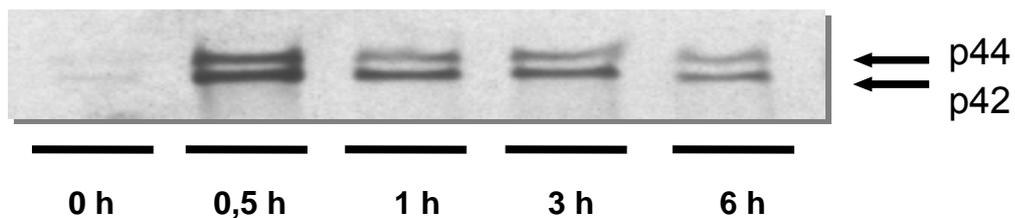


Figura 34A.- Evolución de la fosforilación de ERK 1 y ERK 2 en páncreas durante la pancreatitis aguda. Se muestra un *Western blot* representativo de las formas fosforiladas de ERK1 y ERK2 en páncreas a 0, 0.5, 1, 3 y 6 h tras inducción con taurocolato. La banda superior corresponde a ERK 1 (p44) y la banda inferior a ERK 2 (p42).

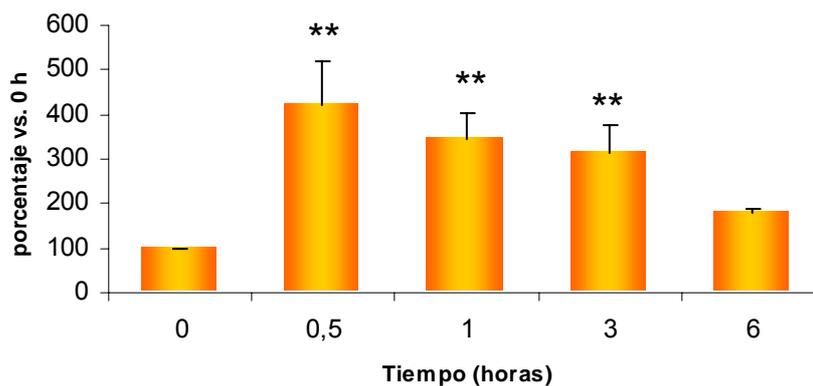


Figura 34B.- Densitometría de la fosforilación de ERK 1 (p44) en páncreas durante la pancreatitis aguda. Los valores se expresan en porcentaje medio respecto al control sin taurocolato y las barras de error a la dispersión de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ vs. control.

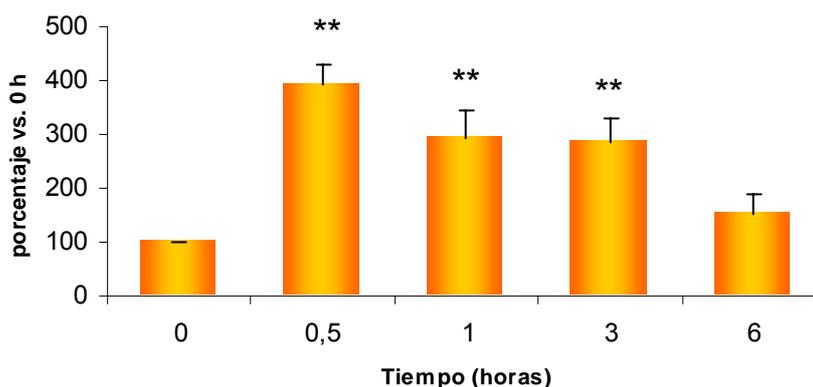


Figura 34C.- Densitometría de la fosforilación de ERK 2 (p42) en páncreas durante la pancreatitis aguda. Los valores se expresan en porcentaje medio respecto al control sin taurocolato y las barras de error de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ vs. control.

5.2. Evolución de la fosforilación de JNK en páncreas durante la pancreatitis aguda necrótica.

En la figura 35A se muestra un gel representativo de la evolución de la fosforilación de JNK en el páncreas tras la pancreatitis inducida por taurocolato. Las figuras 35B y 35C presentan el valor medio y la dispersión de las densitometrías de la fosforilación de JNK a 0, 0.5, 1, 3 y 6h post-inducción de tres experimentos independientes. Se puede destacar que, a diferencia a como ocurría con ERK 1/2, la quinasa JNK apenas posee una fosforilación basal en el páncreas antes de la inducción. Tras aplicar el taurocolato, se produce un gran incremento de la fosforilación de JNK durante la inducción de la pancreatitis aguda (figura 35A). La fosforilación que sufre JNK es muy rápida, al igual que sucede con ERK 1/2, produciéndose un máximo a la media hora de la inducción y disminuyendo progresivamente la fosforilación hasta alcanzar valores similares a los controles a las 6 h de inducción.

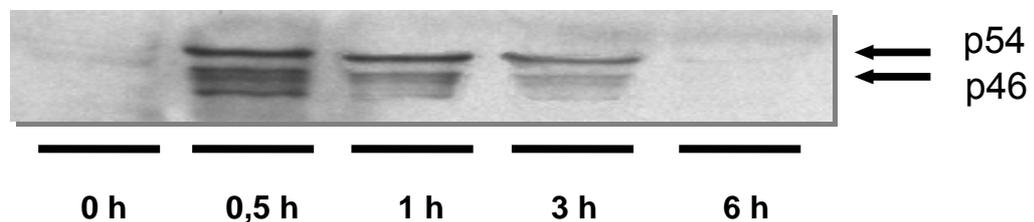


Figura 35A.- Evolución de la fosforilación de JNK en páncreas durante la pancreatitis aguda. Se muestra un *Western blot* representativo de las formas fosforiladas de JNK en páncreas 0, 0.5, 1, 3 y 6 h tras inducción con taurocolato. La banda superior corresponde a JNK1 (p54) y la inferior a JNK 2 (p46).

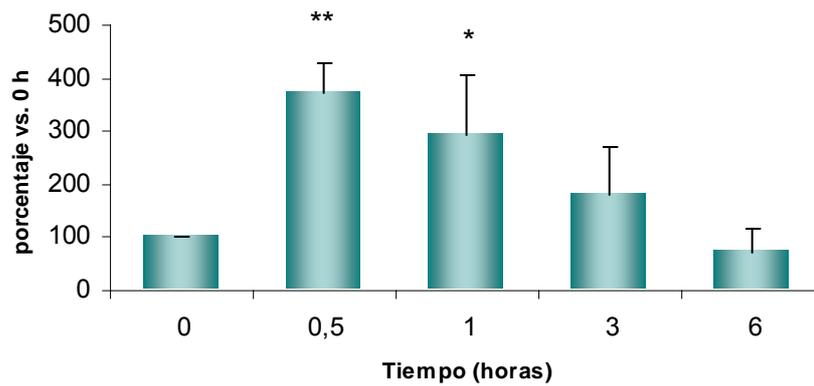


Figura 35B.- Densitometría de la fosforilación de JNK 1 (p54) en páncreas durante la pancreatitis aguda. Los valores se expresan en porcentaje medio respecto al control sin taurocolato y las barras de error de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como $**p<0,01$ vs. control.

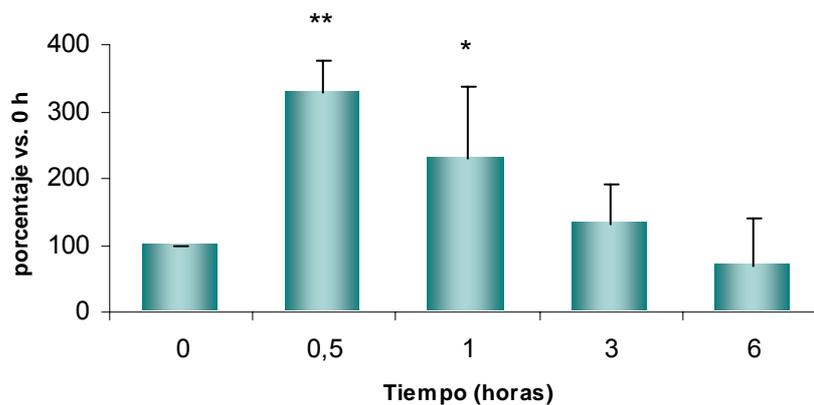


Figura 35C.- Densitometría de la fosforilación de JNK 2 (p46) en páncreas durante la pancreatitis aguda. Los valores se expresan en porcentaje medio respecto al control sin taurocolato y las barras de error de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como $**p<0,01$ vs. control.

5.3. Evolución de la fosforilación de p38 en páncreas durante la pancreatitis aguda necrótica.

La figura 36A presenta un gel representativo de la fosforilación de p38 en el páncreas a 0, 0.5, 1, 3, y 6h después de la inducción de pancreatitis aguda por taurocolato. La Figura 36B el valor medio y la dispersión las densitometrías de la fosforilación de p38 a 0, 0.5, 1, 3 y 6 h post-inducción de tres experimentos independientes. Las densitometrías de la fosforilación de p38 muestran valores significativamente elevados a los 30 min y a 1 h tras la inducción de la pancreatitis aguda con taurocolato. De manera similar a como ocurría con la quinasa JNK, tras la inducción de la pancreatitis en el páncreas se produce una intensa fosforilación de p38, fosforilación que desciende de manera progresiva a tiempos posteriores. Se puede también destacar que los valores basales de fosforilación de p38, en paralelo con los resultados con ERK1/2 o JNK, son apenas detectables.

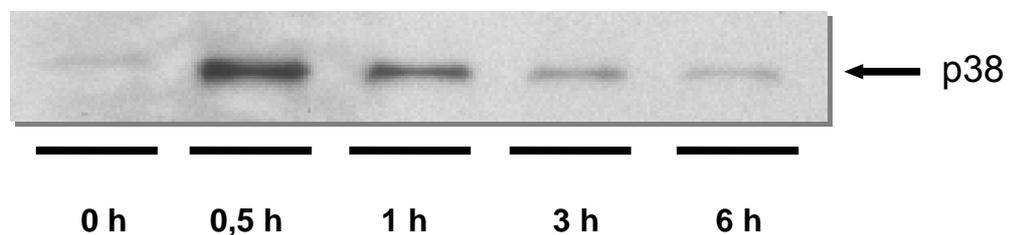


Figura 36A.- Evolución de la fosforilación de p38 en páncreas durante la pancreatitis aguda. Se muestra un *Western blot* representativo de p38 fosforilado en páncreas 0, 0.5, 1, 3 y 6 h después de inducir la pancreatitis aguda.

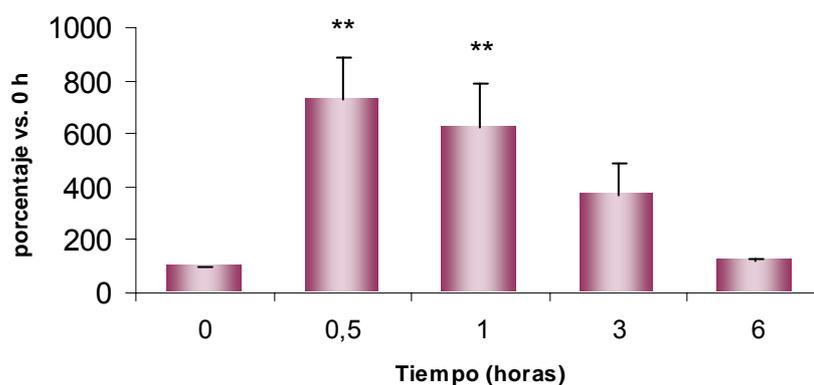


Figura 36B.- Densitometría de la cinética de la fosforilación de p38 en páncreas durante la pancreatitis aguda. Los valores se expresan en porcentaje medio respecto al control sin taurocolato y las barras de error de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ vs. control.

6. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PENTOXIFILINA Y OXIPURINOL SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LAS MAP QUINASAS EN PÁNCREAS EN LA PANCREATITIS AGUDA EXPERIMENTAL NECRÓTICA.

6.1. Efecto de la pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de ERK en páncreas en la pancreatitis aguda experimental necrótica.

Puesto que la fosforilación de las MAP quinasas se produce de manera temprana (figuras 34 a 36) nos propusimos medir el efecto sobre la fosforilación de ERK de tratamientos con compuestos como el oxipurinol, que inhibe la xantina oxidasa y la pentoxifilina, que inhibe la producción de $\text{TNF-}\alpha$, durante la inducción de la pancreatitis aguda. En la figura 37A se puede observar un gel representativo del efecto de los tratamientos sobre la fosforilación de las MAP quinasas ERK. En las figuras 37B y 37C, correspondientes a las densitometrías de los *Western blot* de ERK 1 y de ERK 2 respectivamente, se puede observar que el tratamiento con oxipurinol (OX) previene parcialmente la inducción mediada por el taurocolato mientras que la pentoxifilina (PX) y, en especial el tratamiento combinado (CB), consiguen una prevención completa de la activación de ERK 1/2.

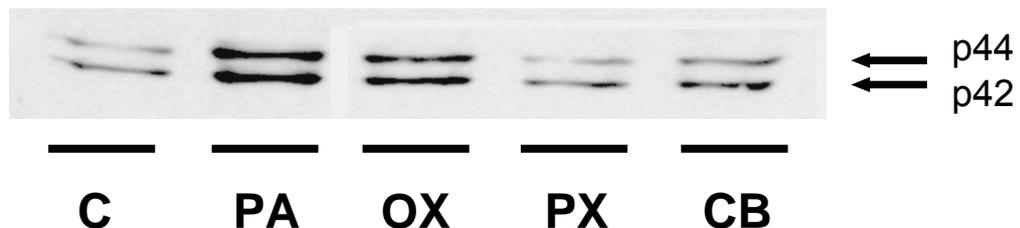


Figura 37A.- Efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de ERK 1/2 en páncreas a los 30 minutos de la inducción de la pancreatitis aguda con taurocolato. Se muestra un *Western blot* representativo de las formas fosforiladas de ERK 1 y ERK 2 en páncreas a la media hora post-inducción. Abreviaturas: **C** = control, **PA** = pancreatitis aguda, **OX** = pancreatitis aguda + oxipurinol, **PX** = pancreatitis aguda + pentoxifilina y **CB** = pancreatitis aguda + tratamiento combinado con oxipurinol y pentoxifilina.

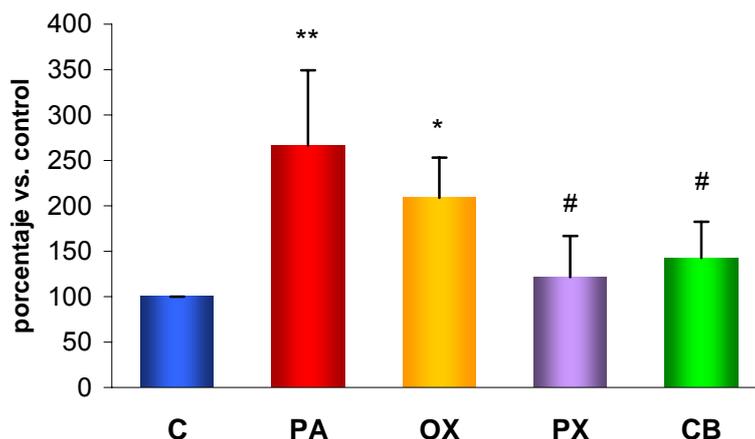


Figura 37B.- Densitometría del efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de ERK 1 (p44) en páncreas a los 30 minutos de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato. Los valores se expresan en porcentaje medio respecto al control sin taurocolato y las barras de error de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ vs. control.

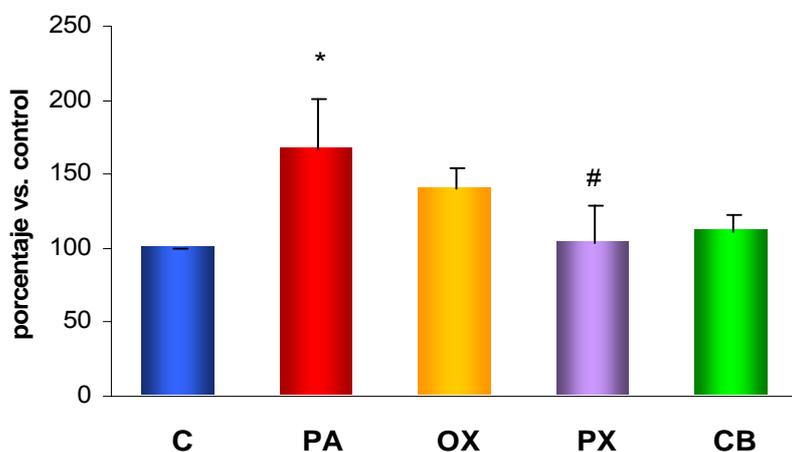


Figura 37C.- Densitometría del efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de ERK 2 (p42) en páncreas a los 30 minutos de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato. Los valores se expresan en porcentaje medio respecto al control sin taurocolato y las barras de error de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ vs. control.

6.2. Efecto del tratamiento con pentoxifilina, oxipurinol sobre la fosforilación de JNK en páncreas en la pancreatitis aguda necrótica.

El efecto de los tratamientos con oxipurinol y pentoxifilina sobre la fosforilación de JNK1 y JNK 2 se determinó en páncreas a los 30 minutos después de inducir la pancreatitis, cuando se produce el máximo de fosforilación en estas quinasas. La figura 38A presenta un *Western blot* representativo en el que se puede observar dicho efecto. Por su parte, las figuras 38B y 38B muestran el valor medio de las densitometrías de tres experimentos independientes tanto de JNK 1 como de JNK 2 respectivamente. Los resultados para las quinasas JNK son similares a los mostrados para las de ERK ya que la pentoxifilina tiene gran poder de inhibición de la fosforilación de JNK, mientras que el oxipurinol no. El tratamiento combinado de nuevo muestra también unos niveles de fosforilación muy similares a los controles.

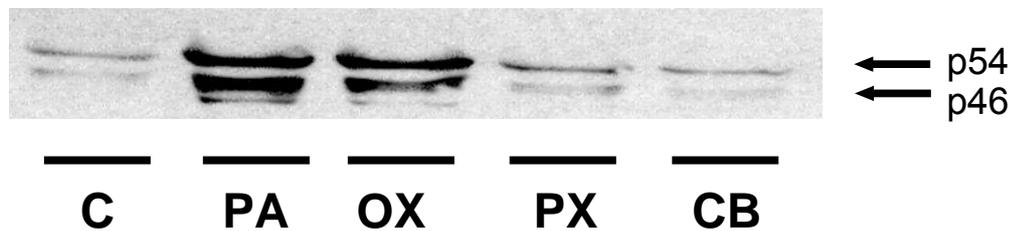


Figura 38A.- Efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de JNK en páncreas a los 30 minutos de la inducción de la pancreatitis aguda con taurocolato. Se muestra un *Western blot* representativo de las formas fosforiladas de JNK 1 y JNK 2 en páncreas a la media hora post-inducción. Abreviaturas: C = control, PA = pancreatitis aguda, OX = pancreatitis aguda + oxipurinol, PX = pancreatitis aguda + pentoxifilina y CB = pancreatitis aguda + tratamiento combinado con oxipurinol y pentoxifilina.

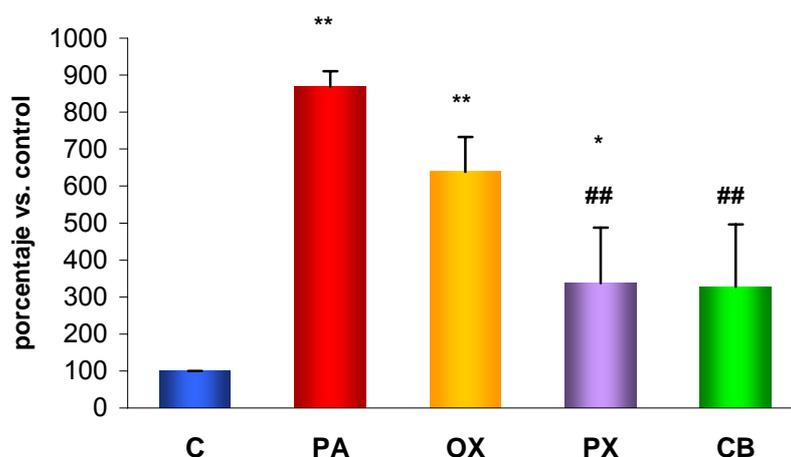


Figura 38B.- Densitometría del efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de JNK 1 (p54) en páncreas a los 30 minutos de la inducción de pancreatitis con taurocolato. Los valores se expresan en porcentaje medio respecto al control sin taurocolato y las barras de error de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. control, ## $p < 0,01$ vs. taurocolato.

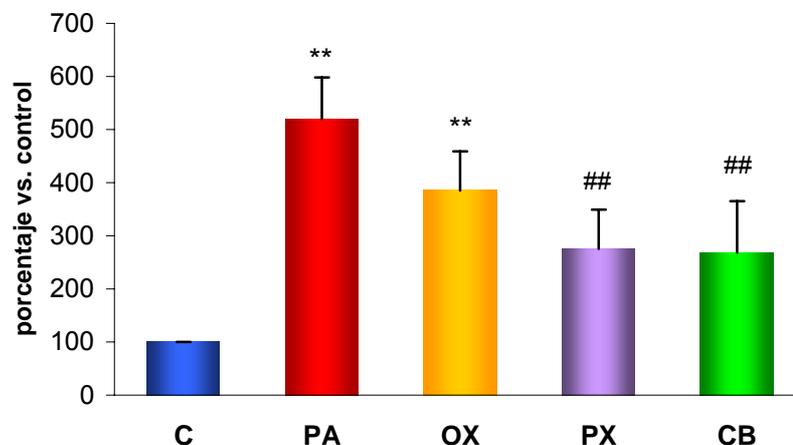


Figura 38C.- Densitometría del efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de JNK 2 (p46) en páncreas a los 30 minutos de la inducción de pancreatitis con taurocolato. Los valores se expresan en porcentaje medio respecto al control sin taurocolato y las barras de error de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ vs. control; ## $p < 0,01$ vs. taurocolato.

6.3. Efecto del tratamiento con pentoxifilina, oxipurinol sobre la fosforilación de p38 en páncreas en la pancreatitis aguda necrótica.

La Figura 39A muestra un gel representativo del efecto del tratamiento con oxipurinol y pentoxifilina sobre la fosforilación de p38. En la figura 39B se presenta media de las densitometrías de tres gels. Se observa una prevención significativa de la fosforilación de p38 por parte del oxipurinol a diferencia de las otras MAP quinastas, donde el efecto inhibitor lo ejerce la pentoxifilina. El mismo efecto se produce si se combina el oxipurinol con la pentoxifilina.

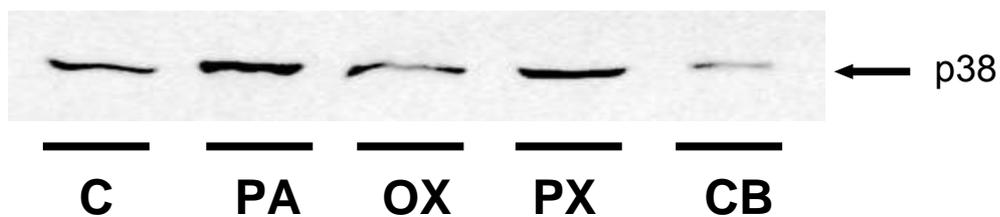


Figura 39A.- Efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de p38 en páncreas a los 30 minutos de la inducción de la pancreatitis aguda con taurocolato. Se muestra un *Western blot* representativo de la forma fosforilada de p38 en páncreas a la media hora post-inducción. Abreviaturas: C = control, PA = pancreatitis aguda, OX = pancreatitis aguda + oxipurinol, PX = pancreatitis aguda + pentoxifilina y CB = pancreatitis aguda + tratamiento combinado con oxipurinol y pentoxifilina.

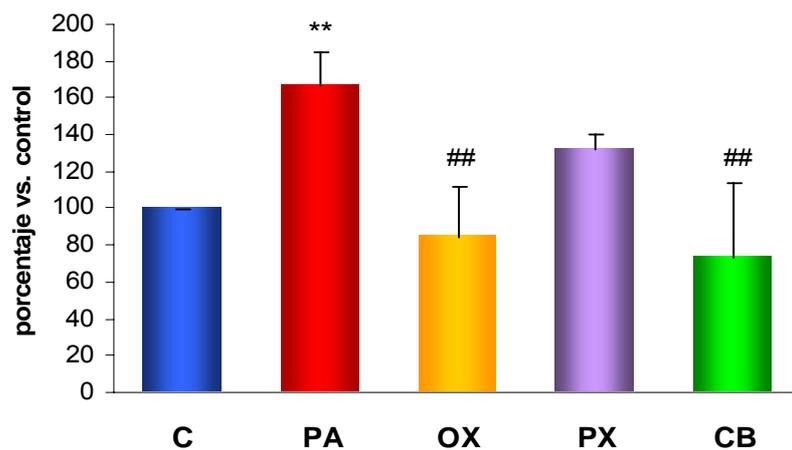


Figura 39B.- Densitometría del efecto del tratamiento con pentoxifilina y oxipurinol sobre la fosforilación de p38 en páncreas a los 30 minutos de la inducción de pancreatitis con taurocolato. Los valores se expresan en porcentaje medio respecto al control sin taurocolato y las barras de error de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ vs. control; ## $p < 0,01$ vs. taurocolato.

7. PAPEL DEL TNF- α EN LA DEPLECIÓN DE GLUTATIÓN PANCREÁTICO EN LA PANCREATITIS AGUDA.

El factor de necrosis tumoral (TNF- α), segregado por el infiltrado inflamatorio e incluso por las propias células acinares del páncreas, podría ser un causante de depleción de glutatión en la pancreatitis aguda. En estudios previos realizados por nuestro grupo hemos observado que la pentoxifilina, que inhibe la producción de TNF- α , es capaz de prevenir la depleción de glutatión en el tejido pancreático. Por tanto, para estudiar el papel que tiene el propio TNF- α en la depleción de glutatión, se analizaron los niveles de glutatión reducido en páncreas de ratones deficientes en el gen del TNF- α , o en sus receptores de membrana, induciendo la pancreatitis con ceruleína. En un primer paso, hemos utilizado ratones deficientes en el gen que codifica para el receptor 1 del TNF- α (KO-RT1), así como ratones deficientes en el gen del receptor 2 del TNF- α (KO-RT2). En la figura 40 se observa una depleción marcada de glutatión tanto en los ratones controles *wild type* como en los deficientes en los receptores tras la administración de ceruleína. No se observan sin embargo diferencias significativas en ninguno de los tres tipos de animales después de la administración de ceruleína ni después de la administración de suero salino.

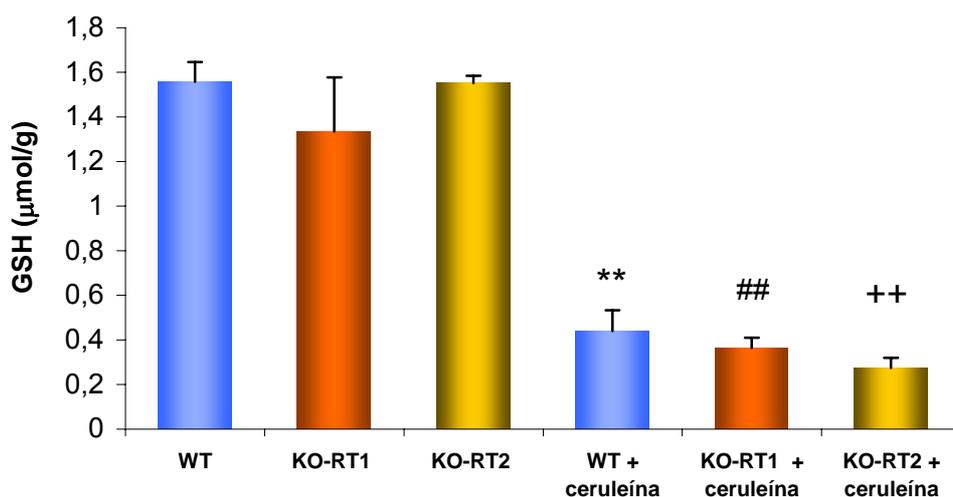


Figura 40.- Niveles de glutatión reducido en páncreas de ratones controles (WT) y deficientes en el receptor 1 del TNF- α (KO-RT1) y en el receptor 2 del TNF- α (KO-RT2) tras la administración de suero salino o tras la administración de ceruleína. Los valores medios se expresan en μ moles/g de glutatión respecto al control y las

barras de error de 3 o 4 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como: ** $p < 0,01$ vs. control; ## $p < 0,01$ vs. KO-RT1; ++ $p < 0,01$ vs. KO-RT2.

En la figura 41 se presentan los resultados del glutatión reducido obtenidos en el caso de los ratones deficientes en el gen que codifica para el TNF- α (KO-TNF α). Se puede observar que se produce una depleción de glutatión debido al tratamiento con ceruleína tanto en el grupo de ratones controles (WT) CEPA *wild type*) como en los deficientes de TNF- α (KO-TNF α). Sin embargo, como ocurría con los resultados anteriormente mostrados, no existen diferencias significativas entre los dos tipos de ratones ni tras administrar suero salino ni en una pancreatitis provocada por ceruleína.

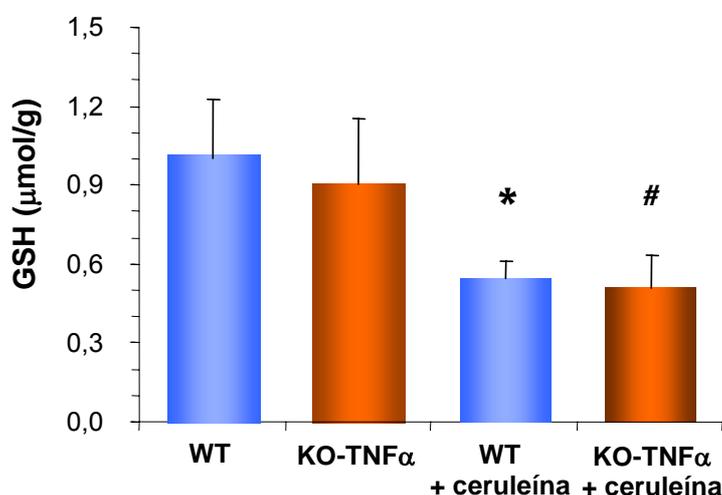


Figura 41.- Niveles de glutatión reducido en ratones controles (WT) y deficientes en TNF- α (KO-TNF- α) en páncreas tras la administración de suero salino o tras la administración de ceruleína. Los valores medios se expresan en μ moles/g de glutatión respecto al control y las barras de error corresponden a 3 o 4 experimentos independientes. Las diferencias significativas se muestran como: * $p < 0,05$ vs. control, # $p < 0,05$ vs. KO-TNF- α .

8. EFECTO DEL TAUCOLATO SOBRE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN ACINOS PANCREÁTICOS AISLADOS. PAPEL DE LAS MAP QUINASAS Y DE LAS PROTEASAS.

8.1. Niveles de glutatión en células acinares aisladas.

El nivel de glutatión reducido en acinos pancreáticos aislados disminuye significativamente cuando se incubaba con taurocolato al 0,01% durante 30 min (figura 42). La preincubación de los acinos pancreáticos con PD 98059, un inhibidor de la vía de ERK, no solo previene la depleción de glutatión sino que incluso eleva significativamente los niveles de éste con tendencia incluso a superar los valores del control. La preincubación con SP 600125, inhibidor de la ruta de JNK 1/2,, es capaz de revertir también de manera significativa el efecto de la depleción de glutatión que causa el taurocolato. Por otra parte, si se utiliza un cóctel que inhibe las principales proteasas, se obtienen niveles de glutatión estadísticamente equiparables al control pero que no muestran diferencias significativas con el tratamiento con taurocolato.

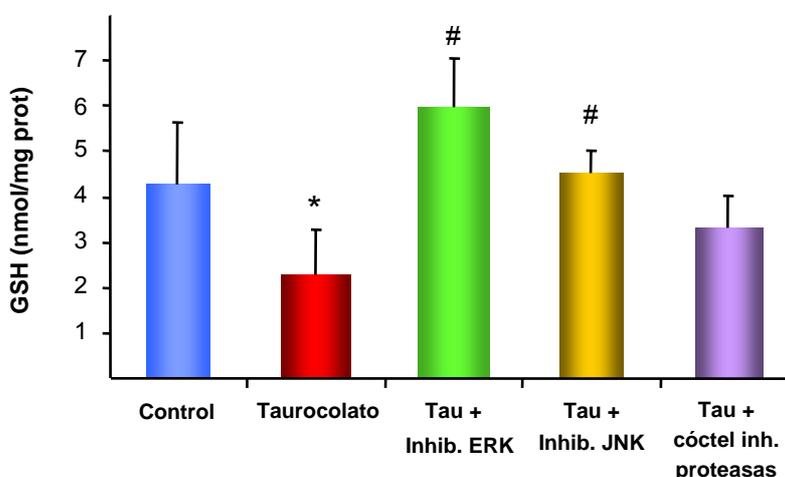


Figura 42.- Efectos del taurocolato y de inhibidores de las rutas de las MAP quinasas e inhibidores de proteasas sobre los niveles de glutatión reducido en acinos pancreáticos aislados. El tiempo de incubación fue de 30 minutos y la concentración de taurocolato empleada fue de 0,01%. Inhib. ERK = PD98059 (50 μ M), Inhib. JNK = SP600125 (50 μ M). Las diferencias significativas se muestran como: * $p < 0,05$ vs. control, # $p < 0,05$ vs. taurocolato. Los valores medios se expresan en nmoles/mg de glutatión respecto al control y las barras de error corresponden a 3 o 4 experimentos independientes.

Para analizar los niveles de glutatión *in vivo* y la depleción inducida por taurocolato, se llevaron a cabo estudios por microscopía confocal de células acinares incubadas con monoclorobimano, un fluorocromo que se une específicamente al glutatión en células vivas (figura 43A). La primera columna (A y D) muestra los niveles de glutatión en las células control, la segunda columna (B y E) en células tratadas con taurocolato 0,01% durante 30 min y la tercera columna (C y F) en células tratadas con taurocolato pero con la vía de ERK 1/2 inhibida con PD 98059. En la figura 43B se resumen los datos de la cuantificación de tres experimentos independientes en donde se miden la fluorescencia de 100 células para cada una de los tratamientos. Al igual que se mostraba en los experimentos de cuantificación de los niveles de GSH bioquímicamente (figura 42) se puede observar una disminución significativa de los niveles de GSH tras el tratamiento de las células acinares con taurocolato. De nuevo, la disminución de los niveles de glutatión que produce el taurocolato se previene al preincubar los acinos pancreáticos con el inhibidor de la vía de ERK 1/2.

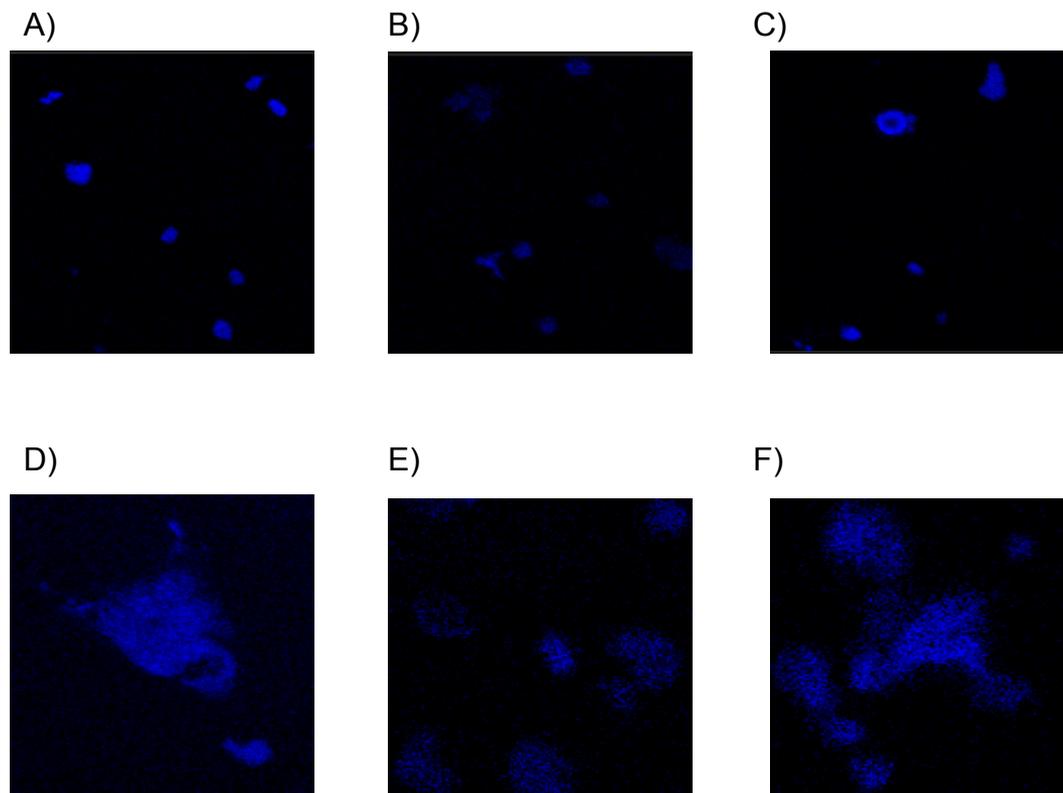


Figura 43 A.- Efecto del taurocolato sobre los niveles de glutatión reducido medido en células acinares de páncreas mediante microscopía confocal y su modulación por la vía de ERK. El glutatión reducido se ha medido utilizando monoclorobimano como fluorocromo específico. La figura presenta imágenes representativas a 20x aumentos (fila superior) y a 40x aumentos (fila inferior) de células control (A, D), de células incubadas con taurocolato (B, E) y de células incubadas con PD 98059 junto con taurocolato (C, F).

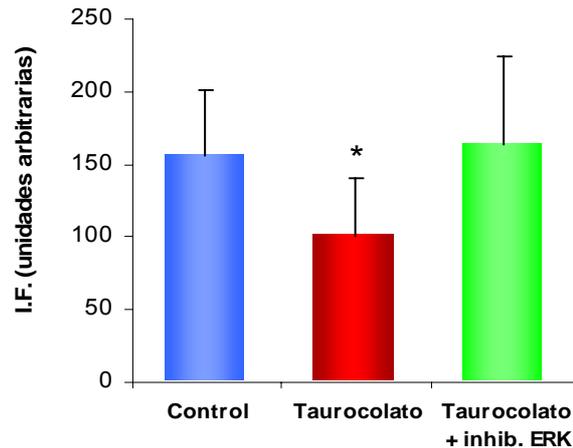


Figura 43 B.- Cuantificación de los niveles de glutatión en células acinares de páncreas medidos mediante microscopía confocal utilizando monoclorobimano como fluorocromo. Efectos del taurocolato y de la inhibición de la vía de ERK. El tiempo de incubación fue de 30 minutos y la concentración de taurocolato empleada fue de 0,01%. El número de experimentos fue de 3 y se midió la fluorescencia en 100 células de cada grupo. Las diferencias significativas se muestran como * $p < 0,05$. Inhib. ERK = PD98059 (50 μ M).

8.2. Fosforilación de las MAP quinasas en el proceso de aislamiento de acinos pancreáticos.

Las MAP quinasas ERK 1/2 y JNK, que evitan la depleción de glutatión que produce el taurocolato (figura 42), se fosforilan en el proceso de aislamiento de acinos pancreáticos como se puede observar en la figura 44. ERK 1/2 se fosforila desde el inicio del aislamiento y se mantiene fosforilada en todas las fases estudiadas (figura 42 A). JNK se fosforila más intensamente tras el proceso de agitación vigorosa y decrece su fosforilación tras 1 h y media de cultivo en placa petri.

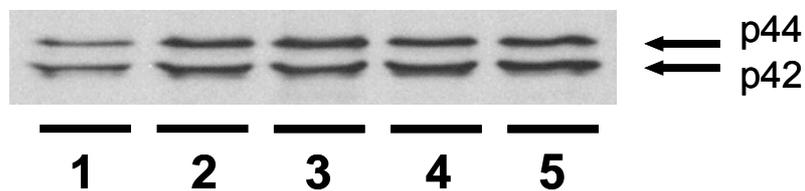


Figura 44 A.- Fosforilación de ERK 1/2 en el proceso de aislamiento de acinos pancreáticos. Se muestra un *Western blot* de la forma fosforilada de ERK 1/2 en diferentes fases del proceso de aislamiento; 1 = páncreas original, 2 = digestión con colagenasa, 3= finalización de agitación vigorosa con colagenasa, 4 = siembra de células en placa petri y 5 = 1 h y media tras la siembra en medio de cultivo.

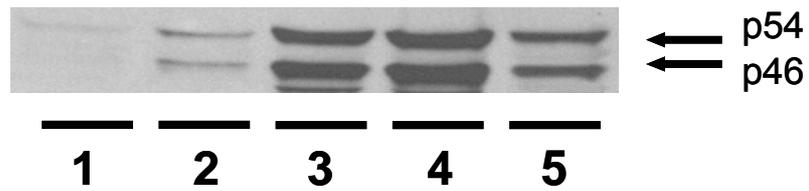


Figura 44 B.- Fosforilación de JNK en el proceso de aislamiento de acinos pancreáticos. Se muestra un *Western blot* de la forma fosforilada de JNK en diferentes fases del proceso de aislamiento; 1 = páncreas original, 2 = digestión con colagenasa, 3= finalización de agitación vigorosa con colagenasa, 4 = siembra de células en placa petri y 5 = 1 h y media tras la siembra en medio de cultivo.

9. DEPLECIÓN DE GLUTATIÓN CAUSADA POR TAUROCOLATO EN CÉLULAS ACINARES AR42J. PAPEL DE LAS MAP QUINASAS Y DE LAS PROTEASAS.

9.1. Caracterización de los niveles de glutatión en células acinares AR42J. Efecto del taurocolato.

Las células AR24J presentan unos niveles de glutatión que varían en función del pase de trabajo utilizado (figura 45). Por ello, para una correcta comparación entre experimentos que se hayan hecho en pases diferentes, se han expresado los valores en porcentaje respecto al control.

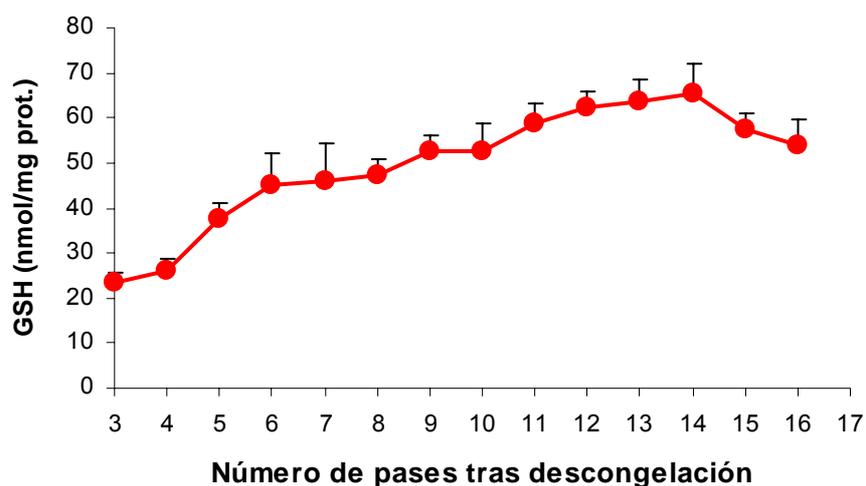


Figura 45.- Variación del contenido de glutatión reducido en las células AR42J tras sucesivos pases posteriores a la descongelación de las células. El número de experimentos fue de 3.

Para conocer el efecto que sobre los niveles de glutatión puede tener el tratamiento con taurocolato, se ha estudiado la curva de dosis-respuesta a este compuesto en células acinares AR42J. La figura 46 muestra que existe una correlación proporcional entre los niveles de glutatión reducido (GSH) de las células AR42J con la concentración de taurocolato empleada en las incubaciones de una hora. Aunque la incubación con taurocolato al 0,8% produce una depleción de hasta un 50% con respecto al control a esos valores se empieza a producir un

elevado porcentaje de muerte celular por necrosis por lo que se eligió una concentración de 0.5% en los experimentos posteriores.

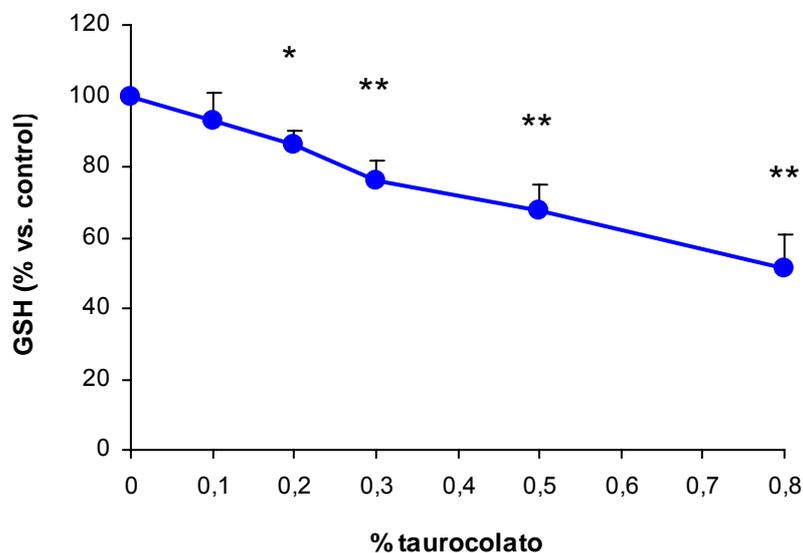


Figura 46.- Curva dosis-respuesta de los niveles de glutatión reducido en células AR42J incubadas con taurocolato. Las células se incubaron durante 1 h con concentraciones de taurocolato entre 0 y 0,8%. Los niveles de glutatión reducido se expresan en porcentaje con respecto a células control. Las diferencias significativas se muestran como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. control. El número de experimentos fue de 4 a 5.

La figura 47 muestra la cinética de la depleción de los niveles de GSH en células acinares AR42J incubadas con taurocolato al 0,5%. Se puede observar una rápida depleción del glutatión reducido en presencia de taurocolato que ya es significativa a tiempos tan cortos como 15 min. Los tiempos de 30 min y superiores producen una progresiva depleción de glutatión hasta valores de hasta un 40% respecto al control a los 120 min.

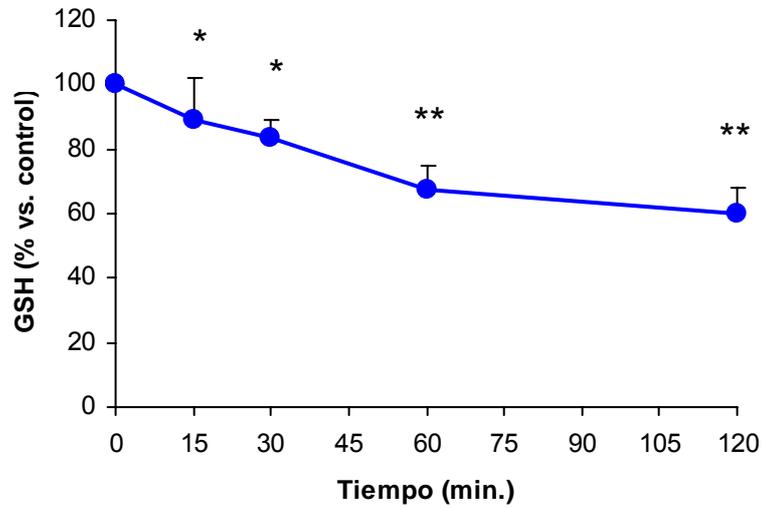


Figura 47.- Evolución de los niveles de glutatión reducido en células AR42J incubadas con 0,5% de taurocolato. Los niveles de glutatión reducido se expresan en porcentaje con respecto a células control. La diferencia significativa se expresa como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. control. El número de experimentos fue de 4 a 5.

9.2. Efecto de la inhibición de las MAP quinasas en la depleción de glutatión producida por taurocolato en células AR42J.

En base a los resultados del apartado anterior con los acinos pancreáticos, se procedió a estudiar el efecto de la inhibición de las MAP quinasas sobre la depleción del glutatión inducida por el taurocolato en células acinares AR42J. Se midieron los niveles de GSH en células incubadas 1 h con 0.5% de taurocolato en presencia de diferentes inhibidores de MAP quinasas (figura 48). Como se observa en la figura, los valores de glutatión tras la incubación con taurocolato disminuyen significativamente hasta un $68,4 \pm 7,6\%$ ($p < 0,01$) respecto al control no tratado. La preincubación de las células con el inhibidor de la ruta de la quinasa MEK, PD98059, previene esta depleción de glutatión alcanzando valores de $84,1 \pm 9,9\%$ ($p < 0,01$). Por otra parte, el péptido inhibidor de ERK 1/2 es capaz de ejercer el mismo efecto protector, así como la utilización conjunta del inhibidor de MEK y del inhibidor de la síntesis de proteínas actinomicina D.

Respecto a las otras rutas de quinasas activadas por el taurocolato, la preincubación con el inhibidor de JNK, SP 600125, tiene un efecto significativo menor, mientras que el inhibidor de la ruta de p38, SB 203580, no parece ejercer ningún efecto sobre la depleción de GSH. Por último, para saber si hay un efecto sinérgico en la depleción del glutatión por la inhibición de las rutas de MEK y de JNK, al utilizar conjuntamente los inhibidores de las mismas obtenemos una prevención significativa similar a la ejercida por el inhibidor de MEK solamente.

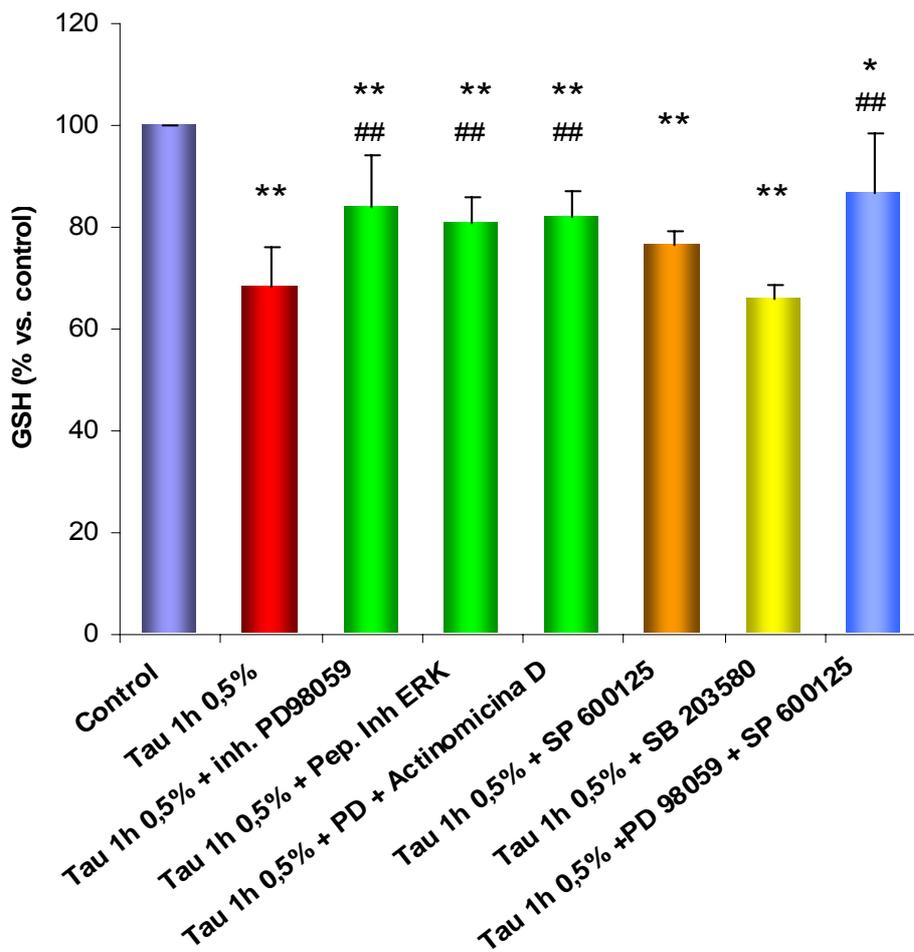


Figura 48.- Niveles de glutatión reducido en células AR42J incubadas durante una hora con una concentración de taurocolato de 0,5% y en presencia de diferentes inhibidores de las MAP quinastas. Los valores de glutatión reducido se expresan en porcentaje con respecto a las células control. Se han utilizado los siguientes inhibidores: PD 98059, Péptido inhibidor de ERK, actinomicina D, SP 600125 y SB 203580. La diferencia significativa se muestra como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. control; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. taurocolato 0,5% 1 h. El número de experimentos fue de 3 a 5.

Con el fin de confirmar la activación de ERK en células AR42J incubadas con taurocolato, y su inhibición con los agentes empleados, se ha estudiado la fosforilación de ERK mediante *Western blot* (Figura 49A). En la figura se observa una intensa fosforilación de ERK 1/2 al incubarse con taurocolato, fosforilación que se previene en gran medida al utilizar el inhibidor PD 98059 de la MAP quinasa. El inhibidor de JNK, SP 600125, también muestra una capacidad de inhibir la fosforilación de ERK 1/2 pero en menor medida que la que ocurre con el de la MAP quinasa. La combinación de ambos inhibidores sí que muestra un efecto sinérgico en la prevención de la activación de la ruta de la quinasa ERK 1/2 (Figura 49B).

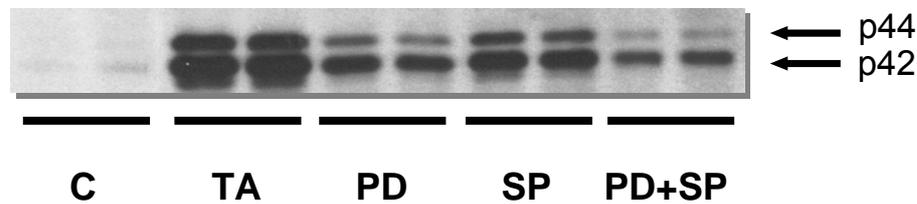


Figura 49A.- *Western blot* de un gel representativo de la fosforilación de ERK en células AR42J incubadas con taurocolato al 0,5% durante 1 hora y de su inhibición mediante inhibidores específicos. Abreviaturas: C= control, TA = taurocolato, PD = taurocolato + PD 98059, SP = taurocolato + SP 600125 y PD+SP = taurocolato + PD 98059 + SP 600125.

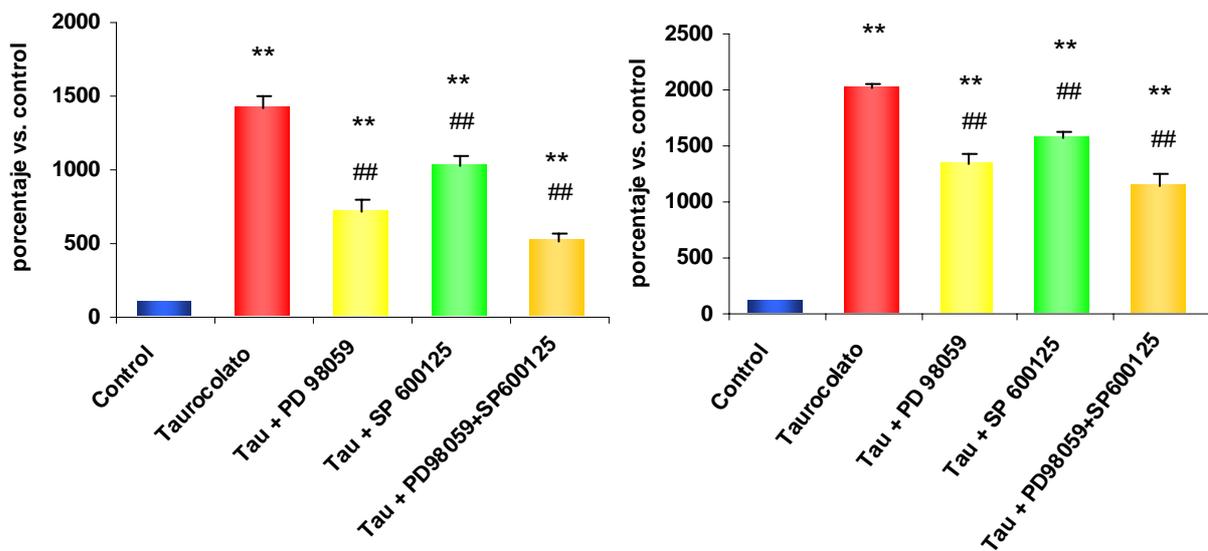


Figura 49B.- Densitometría de la fosforilación de ERK 1 (izquierda) y de ERK 2 (derecha) en células AR42J incubadas con mediante taurocolato al 0,5% durante 1 hora y de su inhibición mediante inhibidores específicos. Los valores se expresan en porcentaje respecto al control. Las diferencias estadísticas se muestran como: ** $p < 0,01$ vs. control, ## $p < 0,01$ vs. taurocolato. El número de experimentos fue de 3.

9.3. Efecto de la inhibición de proteasas en la depleción de glutatión producida por el taurocolato en células AR42J.

Para conocer si la depleción del glutatión inducida por taurocolato pudiera deberse a la posible degradación proteolítica de las enzimas capaces de sintetizar este compuesto, se estudió el efecto de inhibidores específicos de los diferentes tipos de proteasas sobre dicha depleción (Figura 50). Para ello, se incubaron las células AR42J con taurocolato y con un cóctel de inhibidores de proteasas y, después de observar prevención de la depleción, se estudiaron los efectos de cada uno de los componentes del cóctel por separado. Los niveles de GSH tras preincubar con dicho cóctel e incubar con taurocolato fueron de $93,7 \pm 8,2$ % con respecto al control, de manera que se evita de manera significativa ($p < 0,01$) la depleción de glutatión reducido que se produce por la incubación con taurocolato. Utilizando los inhibidores del cóctel por separado se puede observar que la capacidad de inhibir la depleción de glutatión se debe al inhibidor de proteasas de serina AEBSF.

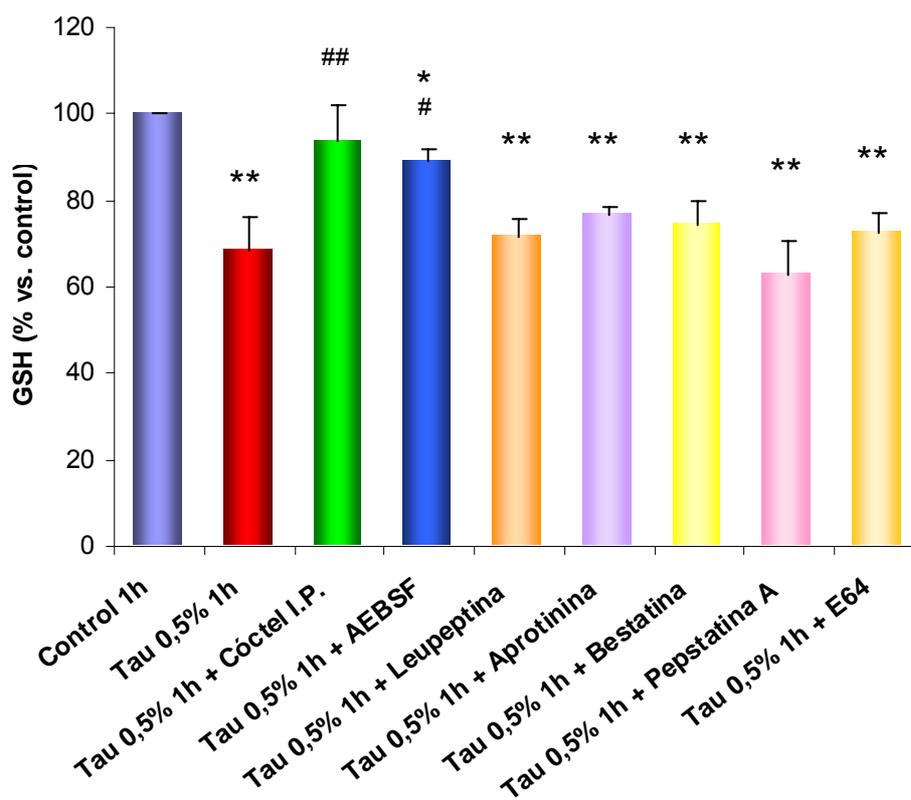


Figura 50.- Niveles de glutatión reducido (GSH) en células AR42J incubadas durante 1 h con taurocolato 0,5% y con diferentes inhibidores de proteasas. Los valores de glutatión reducido se expresan en porcentaje con respecto a células control. Abreviaturas utilizadas: Tau = taurocolato, Cóctel I.P. = cóctel inhibidor de proteasas, AEBSF = 4-

(2-Aminoetil)-bencenosulfonil fluoruro clorhídrico. La diferencia significativa se presenta como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. control; # $p < 0,05$ vs. taurocolato 0,5% 1 h, ## $p < 0,01$ vs. taurocolato 0,5% 1 h. El número de experimentos fue de 3 a 5.

Se ha estudiado también el posible papel de las proteasas lisosomales en la depleción del glutatión para lo cual se han utilizado inhibidores de la actividad autofágica ejercida por los lisosomas, como son la monensina y la 3-metiladenina (Figura 51). Los niveles de GSH permanecen inalterados con dichos inhibidores al incubarse las células con taurocolato. Por otro lado, resultados similares se observan al utilizar lactacistina, que es un inhibidor específico del proteasoma, lo que indica que la depleción no se previene tampoco al inhibir el proteasoma.

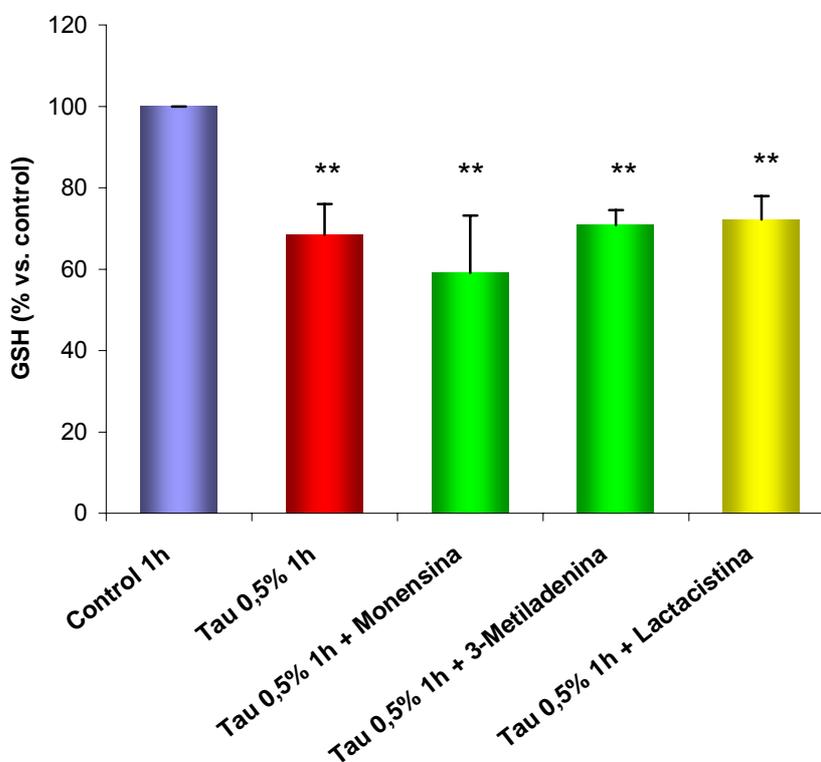


Figura 51.- Niveles de glutatión reducido (GSH) en células AR42J incubadas durante 1 h con taurocolato 0,5% y con inhibidores de proteasas lisosomales (monensina y 3-metiladenina) y del proteasoma (lactacistina) Los valores de glutatión reducido se expresan en porcentaje con respecto a células control. Abreviatura utilizada: Tau = taurocolato. La diferencia significativa se presenta como: ** $p < 0,01$ vs. control. El número de experimentos fue de 3 a 5.

9.4. Papel del calcio y de la γ -glutamil transpeptidasa sobre la depleción de glutatión causada por taurocolato en células AR42J.

Para intentar dilucidar el mecanismo de la depleción de glutatión causada por taurocolato se han ensayado también otros tipos de agentes. Así, como compuesto capaz de eliminar el calcio se ha utilizado BAPTA, un quelante específico del calcio que captura el calcio libre de las células. Otro agente ensayado es la acivicina, compuesto capaz de inhibir la γ -glutamil transpeptidasa, única enzima descrita hasta la fecha capaz de hidrolizar el enlace γ -glutamilo del glutatión. Los niveles de glutatión obtenidos tras la incubación con taurocolato y estos agentes se pueden observar en la figura 52. La depleción producida por el taurocolato no se revierte con el tratamiento de las células con dichos compuestos.

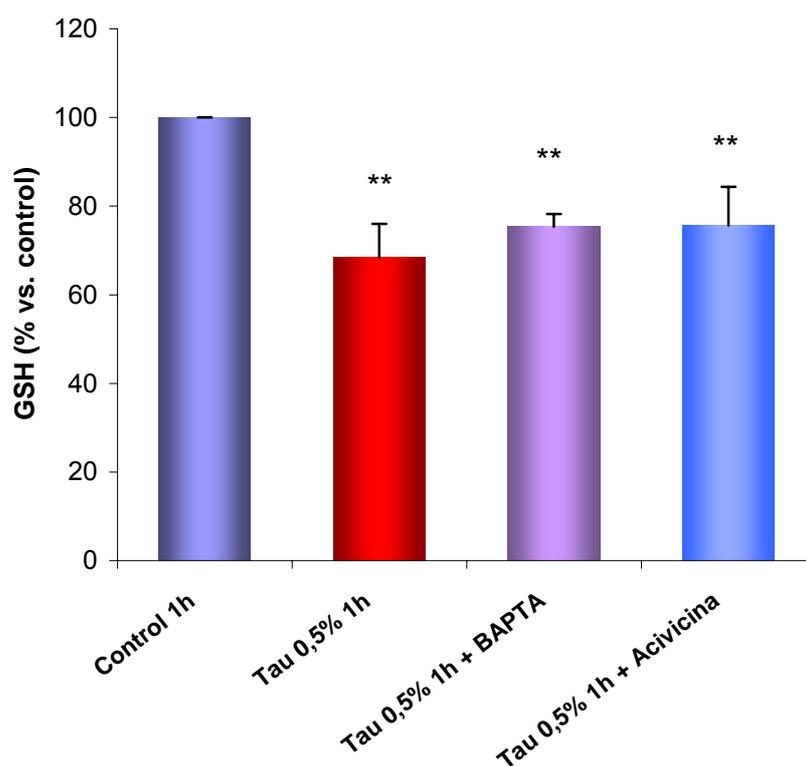


Figura 52.- Niveles de glutatión reducido en células AR42J incubadas durante 1 h con taurocolato 0,5% (Tau), con quelante de calcio (BAPTA), y con inhibidor de γ -glutamil transpeptidasa (acivicina). Los valores de glutatión reducido se expresan en porcentaje con respecto a células control. La diferencia estadística se muestra como: ** $p < 0,01$ vs. control. El número de experimentos fue de 3 a 5.

9.5. Efecto del glutatión monoetil éster sobre la depleción de glutatión producida por taurocolato en células AR42J.

La depleción que causa el taurocolato de glutatión reducido en células AR42J puede ser revertida por el glutatión monoetil éster. En la pancreatitis aguda experimental, el glutatión monoetil éster ha mostrado efectos beneficiosos al restablecer los niveles pancreáticos de GSH (Neuschwander-Tetri y cols., 1992). Existe una relación entre la dosis administrada del éster con la concentración de glutatión en las células. Como se presenta en la figura 53, la concentración de GSH 20 mM fue la única capaz de mantener niveles de GSH intracelulares similares a los del control.

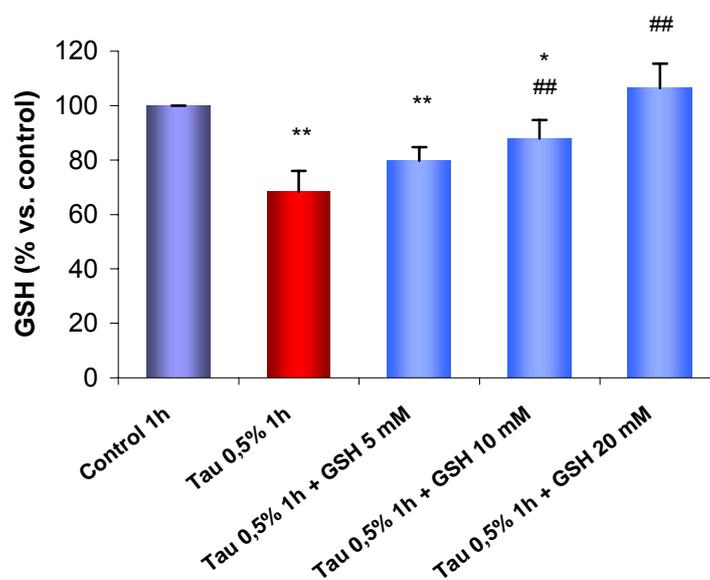


Figura 53.- Niveles de glutatión reducido en células AR42J incubadas durante una hora con taurocolato al 0,5% y con diferentes concentraciones de glutatión monoetil éster. Los valores se expresan en porcentaje con respecto a células control. La diferencia estadística se muestra como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. control; ## $p < 0,01$ vs. taurocolato 0,5% 1 h. El número de experimentos fue de 3.

10. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR Y DEL TIPO DE MORTALIDAD EN CÉLULAS AR42J INCUBADAS CON TAUROCOLATO.

Dado que la disminución del glutatión puede suponer el desencadenante de la muerte celular en los cultivos de AR42J en presencia de taurocolato, se ha estudiado mediante medida de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH). Esta actividad, y la de proteína en placa, se pueden usar como estimación de la mortalidad celular al medirse aquellas en el medio extracelular de una enzima intracelular como es la LDH, que se libera al medio si se compromete la integridad de la membrana celular. En la figura 54 se muestra la actividad LDH expresada como porcentaje con respecto a un sonicado celular que presenta el 100 % al tener sólo células lisadas. El taurocolato 0,5% libera un $50,8 \pm 5,4$ % de LDH al medio extracelular mientras que el inhibidor AEBSF disminuye de manera significativa esta liberación a un $38,6 \pm 3,10$ %. El inhibidor de la quinasa MEK, PD98059, mantiene invariable la actividad extracelular de LDH con respecto al taurocolato. Los valores de proteína en placa mantienen una relación similar a la actividad LDH (fig. 55). El inhibidor PD98059 mantiene invariable la cantidad de proteína en la placa tras la incubación con taurocolato mientras que AEBSF aumenta significativamente la cantidad de proteína en placa con respecto a la incubación con taurocolato.

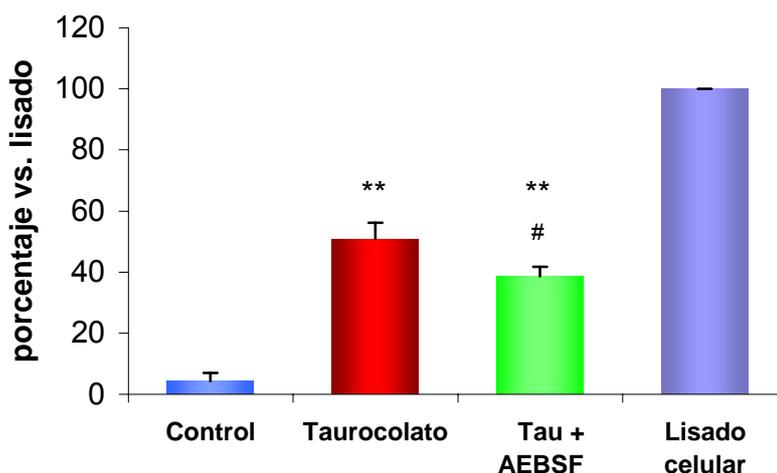


Figura 54.- Liberación de LDH al medio de cultivo tras el tratamiento de las células AR42J con taurocolato al 0,5% durante 1 h y con el inhibidor AEBSF. El resultado se presenta en porcentaje respecto al lisado. La diferencia estadística se muestra como: **p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. taurocolato 0,5% 1 h. El número de experimentos fue de 3.

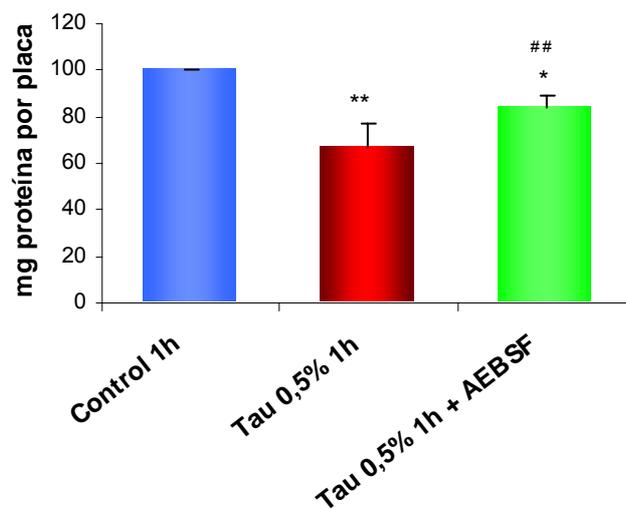


Figura 55.- Cantidad de proteína en placa después de la incubación de las células AR42J con taurocolato 0,5% durante 1 h y con el inhibidor AEBSF. La diferencia estadística se muestra como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. control; ## $p < 0,01$ vs. taurocolato 0,5% 1 h. El número de experimentos fue de 3 a 5.

Finalmente, para la caracterización del tipo de muerte celular producida por taurocolato, se han realizado estudios de microscopía confocal utilizando fluorocromos específicos de necrosis y apoptosis. Se ha ensayado la mortalidad celular con yoduro de propidio, que no es capaz de atravesar las membranas de las células vivas, pero que al morir la célula por necrosis y perder su integridad, se une al ADN nuclear y produce fluorescencia de color rojo. Si la célula entra en apoptosis, externaliza en su membrana la fosfatidilserina, un fosfolípido que en condiciones normales se encuentra en la parte citoplasmática de la membrana. La anexina V es un fluorocromo que se une específicamente a este fosfolípido y muestra una fluorescencia de color verde si encuentra accesible este lípido en la cara externa de la membrana celular. Cabe resaltar que si la integridad de la membrana está comprometida, este fluorocromo penetraría en la célula y uniéndose al fosfolípido interno emitiría también fluorescencia. Por último, para detectar niveles de glutatión, hemos utilizado monoclorobimano, un fluorocromo con estructura en forma de “dos manos” que se combina con el GSH reducido específicamente utilizando glutatión transferasa y muestra fluorescencia de color azul. En la figura 56 se observan células AR42J en condiciones normales que tienden a formar pequeñas agrupaciones que recuerdan a acinos pancreáticos. Como es de esperar, las células al tener niveles elevados de glutatión muestran una fluorescencia intensa del color azul y no muestran apenas mortalidad al encontrar ausencia de color rojo (necrosis) y verde (apoptosis).

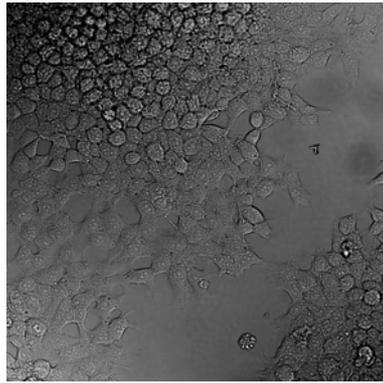


Figura 56.- Imagen de las células AR42J mediante microscopía confocal sin utilizar fluorocromos.

Cuando se incuban las células con taurocolato al 0,5% durante 1 h, se pueden observar grandes cambios con respecto al control. Nos encontramos con un gran descenso en los niveles de glutatión intracelular (figura 57A) y una gran mortalidad (figura 57B). La anexina V se une también a algunas células que no se han teñido por el yoduro de propidio indicando que hay células que no han muerto por necrosis y que entran en apoptosis (figura 57B).

Si se ensaya el AEBSF, previamente a la incubación con taurocolato, se puede apreciar valores más elevados de glutatión (figura 57A) y menor mortalidad por necrosis en la tinción con el yoduro de propidio, pero niveles mayores de fluorescencia de anexina V comparados con el taurocolato (figura 57B).

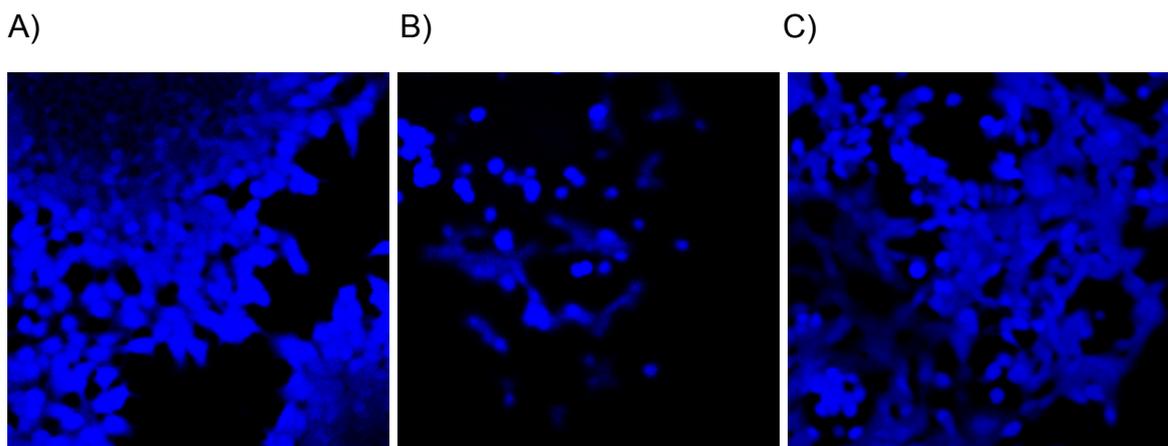


Figura 57A.- Efectos del taurocolato y del AEBSF sobre los niveles de glutatión en células AR42J medidos mediante microscopía confocal utilizando monoclorobimano como fluorocromo específico. Las células se han incubado en ausencia de adiciones (A), en presencia de taurocolato 0,5% (B) así como taurocolato y AEBSF (C).

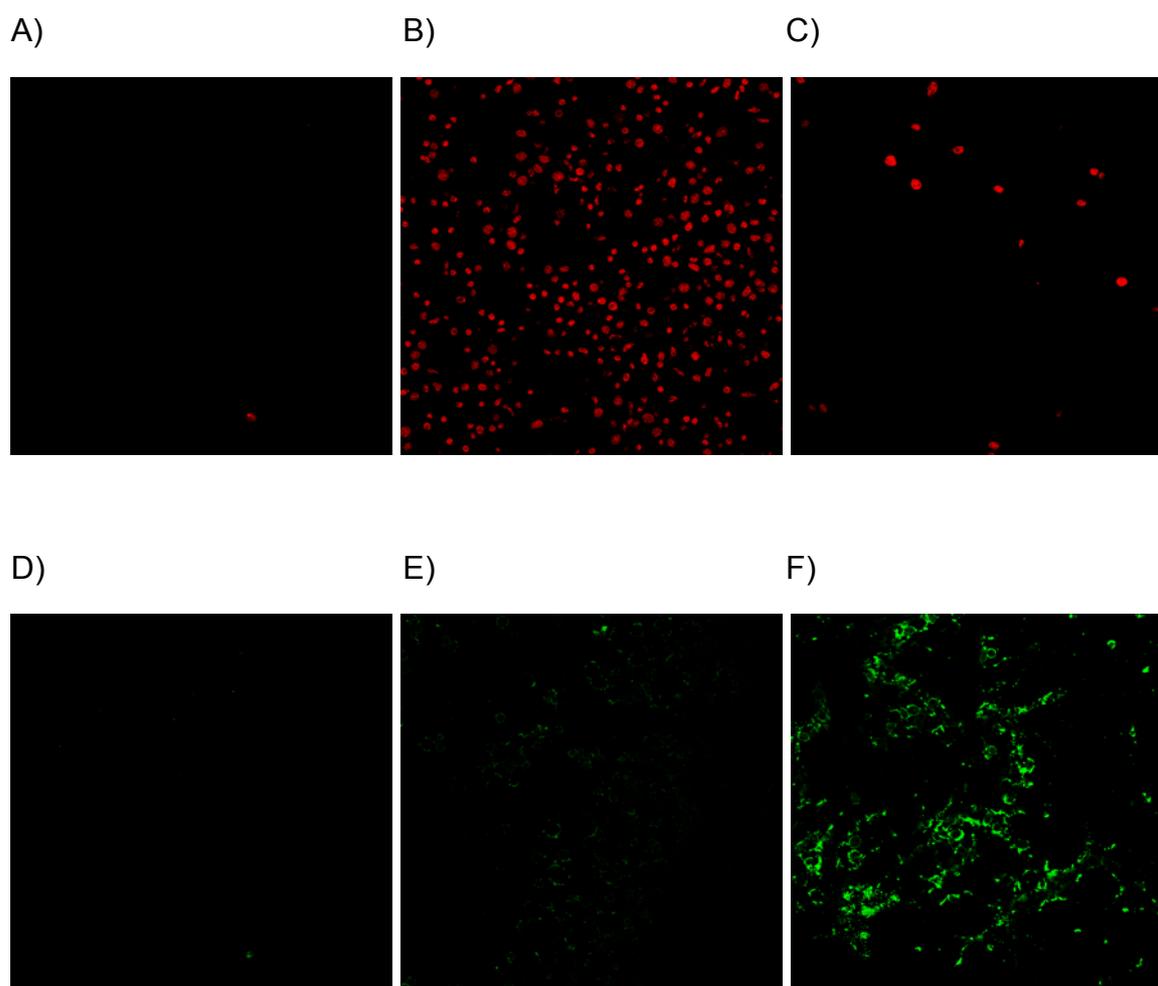


Figura 57B.- Efectos del taurocolato y del AEBSF sobre el tipo de muerte celular en células AR42J estudiado mediante microscopía confocal utilizando fluorocromos específicos de necrosis (ioduro de propidio) y de apoptosis (anexina V). Las células se han incubado con ioduro de propidio (A, B, C) y con anexina V (D, E, F) sin adiciones (A y D), en presencia de taurocolato 0,5% (B y E) así como taurocolato y AEBSF (C y F).

V-DISCUSIÓN

1. MODELOS EXPERIMENTALES DE PANCREATITIS AGUDA.

Hay que destacar los avances que se han realizado para la comprensión de los mecanismos intracelulares responsables del inicio y desarrollo de la pancreatitis aguda utilizando diferentes modelos experimentales (Lerch y Adler, 1994). Además, estos modelos experimentales se emplean para ensayar diferentes estrategias terapéuticas y realizar una selección de aquellas que puedan tener interés clínico. En la presente tesis se han utilizado dos modelos experimentales de pancreatitis aguda, el modelo de pancreatitis aguda necrótica mediante perfusión de taurocolato sódico en el conducto biliopancreático y el modelo de pancreatitis aguda edematosa inducida por hiperestimulación con ceruleína.

El modelo de pancreatitis aguda necrótica inducido por taurocolato fue descrito y desarrollado por Aho en los años 80 (Aho y cols., 1980) y se aproxima a los fenómenos que ocurren en una pancreatitis aguda de origen biliar en humanos (Aho y cols., 1983). Se trata de perfundir retrógradamente sales biliares (en concreto, taurocolato sódico) en el conducto biliopancreático. En este modelo, la secuencia de acontecimientos que tiene lugar durante las primeras fases de la pancreatitis aguda experimental parece deberse al efecto detergente del taurocolato. Se produce una disolución inmediata de las paredes ductales y de los lóbulos adyacentes, con infiltrado eritrocitario en el intersticio. Las membranas celulares se desestabilizan por efecto del taurocolato, permitiendo que se incremente la concentración de calcio en el citoplasma y también facilitando la fusión de los lisosomas con los gránulos de zimógeno. El tripsinógeno, precursor de la tripsina, se activa transformándose en tripsina por colocalización de ambos orgánulos, provocando una pancreatitis aguda necrohemorrágica. Una vez activada la tripsina, se desencadena una cascada de activación de enzimas proteolíticas e hidrolíticas. Se produce también la conversión de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa que, con las grandes cantidades de hipoxantina y xantina producidas en el catabolismo de las purinas asociado a la elevada mortalidad celular, genera cantidades importantes de radicales libres de oxígeno y ácido úrico. Los radicales libres y el infiltrado inflamatorio atacan a otras células vecinas no afectadas por el taurocolato, manteniéndose una cadena que acaba por afectar prácticamente a todo el lobulillo pancreático produciéndose necrosis en grandes extensiones.

En los primeros estudios de Aho y colaboradores, se obtuvo una mortalidad del 24% al utilizar una concentración de 3% de taurocolato (Aho y cols., 1980).

Utilizando una concentración de 4,5% se produjo la muerte del 71% de los animales empleados. En ambos casos la mortalidad se producía en las primeras 72 h. Empleando una concentración del 5% se producía una mortalidad del 100% en las primeras 24 h (Aho y cols., 1980). Los resultados obtenidos por nuestro grupo son similares en cuanto a la mortalidad descrita por Aho, y así con una concentración del 3,5% hemos observado un 20% de mortalidad (Pereda y cols., 2004). Se trata pues de un modelo experimental en el cual la severidad y mortalidad dependen de la concentración y el volumen de la solución de sal biliar administrada, a diferencia de otros modelos experimentales como el de ceruleína. Los resultados que se obtienen, al utilizar una bomba de perfusión, son reproducibles en cualquier laboratorio debidamente equipado, constituyendo un buen modelo para el estudio de la pancreatitis aguda grave. Es por tanto un modelo que tiende a causar una pancreatitis severa, en la que la mortalidad se debe no sólo a los efectos locales, sino también a los efectos sistémicos precoces que provoca.

Para el trabajo con ratones *knockout* se utilizó un modelo de pancreatitis experimental inducida por un secretagogo. La inducción de pancreatitis tras la administración de un análogo de la colecistoquinina, la ceruleína, a dosis supramáximas (unas 50 veces superior a la máxima) fue descrita por Lampel, Kern y Alder en los años 70 (Lampel y Kern, 1977). Las grandes dosis del análogo hormonal provocan un bloqueo de la secreción de gránulos de zimógeno que colocalizan con lisosomas produciéndose la activación de la tripsina (Hofbauer y cols., 1998). Este modelo, edematoso en ratas (Lampel y Kern, 1977), produce una forma necrotizante en ratones (Niederau y cols., 1985). Puesto que es no es técnicamente posible la canulación y perfusión de dichos animales correctamente para la perfusión de taurocolato, se eligió este modelo que también produce alteraciones pulmonares y es necrotizante a nivel local al igual que el modelo de pancreatitis inducida por taurocolato.

En nuestro modelo experimental con taurocolato al 3,5% en ratas, la correcta inducción de la pancreatitis se ha confirmado por el rápido y marcado aumento de la actividad lipasa en suero, y por el estudio histológico (Pereda y cols., 2004).

Otros órganos, como el pulmón, se ven afectados como consecuencia de la afectación pancreática. De hecho, hemos observado en pulmón un incremento de la actividad de la mieloperoxidasa, una enzima típica de los neutrófilos y que nos indica infiltrado leucocitario. Los valores se elevan significativamente a partir de las 3 h y se mantienen elevados incluso a las 9 h de la inducción de la pancreatitis aguda experimental (Pereda y cols., 2004).

Histológicamente se confirma un infiltrado inflamatorio pulmonar con formación de edema intersticial, además de engrosamiento de la pared alveolar y

destrucción de la misma resultando en un edema pulmonar típico del distrés respiratorio indistinguible del producido por otros orígenes. Nos encontramos por tanto con un modelo que asemeja a la pancreatitis aguda grave de origen biliar en humanos, con una mortalidad similar y con efectos sistémicos caracterizados por una gran afectación a nivel pulmonar.

Existen otros modelos de pancreatitis aguda necrótica ampliamente utilizados, como el modelo inducido por una dieta suplementada en colina y deficiente en etionina (Lombardi y cols., 1975). Debido a que los estrógenos y/o la incapacidad de neutralizar la activación de enzimas es determinante en la inducción de pancreatitis con esta dieta, sólo se pueden utilizar ratas o ratones jóvenes hembra. Se produce una pancreatitis hemorrágica con una mortalidad del 80 al 100% después de 2 a 8 días pero se afectan órganos como el hígado y el sistema nervioso contribuyendo al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica independientemente de la pancreatitis aguda. Además, es un modelo con un desarrollo muy variable debido en parte a las diferencias entre los pesos de los animales y las dietas administradas. La administración de grandes dosis de L-arginina intraperitonealmente también provoca una pancreatitis necrotizante (Mizunuma y cols., 1984), pero no conlleva una mortalidad elevada en ratas.

La obstrucción del conducto pancreático se acerca a la pancreatitis aguda producida por cálculos que dificultan la secreción normal del páncreas. La teoría del conducto común de Opie (Opie, 1901), que sugiere que las sales biliares son las responsables del inicio de la pancreatitis aguda cuando se acumulan en el páncreas, ha sido cuestionada en los últimos años. El ligamiento del conducto pancreático sin reflujo de sales biliares procedentes del hígado desarrolla una pancreatitis indistinguible de la producida por el ligamiento que produce un conducto común bilio-pancreático en zarigüeya (Lerch y cols., 1993).

2. ESTRÉS OXIDATIVO Y PANCREATITIS AGUDA.

Durante las últimas décadas, diversos autores han mostrado evidencias indirectas de que el estrés oxidativo juega un papel importante en la pancreatitis aguda (Sanfey y cols., 1984; Guice y cols., 1986; Schöenberg y cols., 1991). Los estudios pioneros del grupo de Sanfey y colaboradores mostraron que el tratamiento con superóxido dismutasa y con catalasa supuso una mejora en la pancreatitis aguda en tres modelos diferentes de pancreatitis aguda en páncreas aislado de perro (Sanfey y cols., 1984). Estos primeros indicios hicieron pensar que el estrés oxidativo podía ser ese agente causal desencadenante de la pancreatitis aguda que se ha estado buscando durante años. Los experimentos posteriores que se han realizado para aclarar este interrogante han demostrado que la generación de estrés oxidativo en el páncreas no es suficiente para producir pancreatitis y los cambios típicos que se observan en el curso de la misma (Fu y cols., 1997; Rau y cols., 2000). Sin embargo, estos mismos estudios apoyan que los radicales libres sean potentes mediadores en el desarrollo de la enfermedad (Rau y cols., 2000).

Se ha sugerido que las principales fuentes de generación de radicales libres son bien el infiltrado inflamatorio (Tsuji y cols., 1994) o bien el sistema xantina deshidrogenasa-xantina oxidasa (Amaya y cols., 1990). Nuestro grupo ha observado un aumento de la actividad xantina oxidasa en plasma tras la pancreatitis aguda (Pereda y cols., 2004). Este aumento puede suponer una fuente de radicales libres tanto a nivel local como a nivel sistémico. En efecto, se ha descrito que localmente la xantina oxidasa ejerce daño oxidativo en el páncreas (Sanfey y cols., 1985), y que parece ser una de las claves de la afectación pulmonar en la pancreatitis aguda al ser movilizada de la pared endotelial por la amilasa pancreática (Granell y cols., 2004a).

El aumento de radicales libres en la pancreatitis se ha puesto en evidencia al estudiar diferentes parámetros de estrés oxidativo. Se ha descrito que los niveles de malondialdehído y de dienos conjugados, índices de peroxidación lipídica, aumentan a la media hora de perfusión de ceruleína en ratas y alcanzan un pico a las 3-5 h (Dabrowski y cols., 1988; Schöenberg y cols., 1990). Posteriormente, disminuyen hasta los niveles propios del control a las 12 h. La presencia de estos productos de peroxidación también se observa en otros modelos experimentales de pancreatitis, como en el modelo inducido con dieta deficiente en colina (Nonaka y cols., 1989), en el modelo de pancreatitis inducido con taurocolato (Schöenberg y cols., 1991) y en el modelo de pancreatitis por obstrucción del conducto biliopancreático (Uruñuela y cols., 2002).

Tras inducir la pancreatitis aguda con taurocolato, se ha observado de forma temprana una oxidación de proteínas que precede a la peroxidación lipídica (Reinheckel y cols., 1998). Los estudios histológicos realizados por Telek y colaboradores han mostrado "in situ" signos de estrés oxidativo (Telek y cols., 1999). En estos estudios histológicos se observan focos de oxidación asociados con el infiltrado leucocitario ya a la hora, pero sobre todo a partir de las 2 h de la inducción con taurocolato.

Puesto que hay evidencias de estrés oxidativo temprano en la pancreatitis aguda, numerosos estudios han utilizado antioxidantes como posibles agentes terapéuticos (Nonaka y cols., 1991; Du y cols., 2003; Sevillano y cols., 2003). Por ejemplo, se han ensayado antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa y la catalasa, con resultados positivos tanto por separado como en tratamientos conjuntos (Sanfey y cols., 1984; Guice y cols., 1986; Koiwai y cols., 1989; Gough y cols., 1990).

3. DEPLECIÓN DE GLUTATIÓN Y PANCREATITIS AGUDA.

Los niveles de glutatión, que es uno de los principales antioxidantes no enzimáticos intracelulares, caen marcadamente durante la pancreatitis aguda inducida por taurocolato (figura 25). Los valores descienden ya en la primera media hora hasta aproximadamente la mitad de los valores control. En la pancreatitis con ceruleína en ratas se produce un descenso del 83,5% (figura 31). En ratones, la pancreatitis aguda inducida con ceruleína produce una depleción del 72% (figura 40). En estudios pioneros utilizando el modelo de pancreatitis aguda inducida con ceruleína en ratones, se observó una depleción muy severa de glutatión total (GSH+GSSG) hasta alcanzar el 17% de los valores normales, expresando los valores por gramo de tejido (Neuschwander-Tetri y cols., 1992). Es interesante destacar que el ATP pancreático, necesario para la síntesis de glutatión, descendía coincidiendo en tiempo con la depleción de glutatión. Los valores tan bajos alcanzados, que pueden ser incompatibles con la vida de la célula, podrían indicar que el tejido estudiado es en gran parte tejido necrótico. Además, el páncreas sufre inflamación y el consecuente edema hace que aumente de peso, de forma que la expresión de los niveles de glutatión por gramo de tejido resulta en valores todavía más bajos. El modelo utilizado en estos estudios es similar al de ceruleína en ratones de la presente tesis, pero se mide el GSH a la hora del último pinchazo, encontrando valores ligeramente más bajos. Después de sufrir el nivel más bajo a la hora, se recupera el glutatión hasta restablecerse por completo a las 48 h (Neuschwander-Tetri y cols., 1992).

A concentraciones bajas de ceruleína –análogas a las fisiológicas de CCK- se encuentra también depleción de glutatión (Niederau y cols., 1989), indicando que la depleción de glutatión puede producirse directamente por la ceruleína además de indirectamente por los efectos derivados del daño tisular en la pancreatitis aguda. Por tanto, se observa una depleción muy marcada tanto con ceruleína como con taurocolato, a pesar que este último es un modelo más severo. En el caso de la ceruleína debe tenerse en cuenta la “dilución” de GSH que produce el edema asociado al modelo.

Como sucede con el estrés oxidativo, la depleción de glutatión “per se” no es capaz de producir una pancreatitis aguda, ya que no aparece en modelos de depleción prolongada de glutatión (Martensson y cols., 1990) ni al disminuir el glutatión pancreático (Luthen y cols., 1994).

No obstante, la gran importancia del mantenimiento de unos niveles adecuados de glutatión se ha demostrado al inhibir su síntesis mediante la L-

butionina-(S, R)-sulfoximina, que es un inhibidor específico de la γ -GCS. Al deplecionar los niveles de glutatión e inducir pancreatitis aguda nos encontramos con una mortalidad casi total, por un aumento de la severidad de la enfermedad en el modelo de perfusión de glicodesoxicólico y estimulación con ceruleína (Alsfasser y cols., 2002). Clínicamente se ha relacionado el estatus de glutatión en plasma con la severidad de la enfermedad, así como determinados polimorfismos en la glutatión transferasa (Rahman y cols., 2004). Por otro lado, la reposición de los niveles de glutatión mediante la administración de glutatión éster en la pancreatitis aguda inducida por ceruleína previene las evidencias histológicas de daño pancreático, disminuyendo la necrosis y la inflamación (Neuschwander-Tetri y cols., 1992).

Está bien establecido pues que el glutatión sufre una depleción marcada en la pancreatitis aguda, y que esta depleción repercute en la gravedad de la enfermedad, pero los mecanismos que causan la depleción son todavía desconocidos. El objetivo de la presente tesis ha sido investigar estos mecanismos que causan depleción severa de glutatión en la pancreatitis aguda.

El cociente glutatión oxidado/glutatión reducido es un índice de estrés oxidativo ampliamente utilizado (Asensi y cols., 1999). En condiciones de estrés oxidativo, el glutatión se oxida mediante la glutatión peroxidasa formando el GSSG. La glutatión reductasa reduce el GSSG restituyendo el GSH. En condiciones fisiológicas, encontramos una relación entre GSH y GSSG que varía de 10 a 100, y pequeños cambios en la cantidad de GSH se transforman en grandes cambios de GSSG (Kosower y Kosower, 1978; Asensi y cols., 1999). En la pancreatitis aguda, estudios previos realizados por nuestro grupo muestran una moderada oxidación del glutatión pancreático significativa a partir de las 3 h después de la inducción de la pancreatitis. Sin embargo, esta elevación de los niveles de GSSG no concuerda en tiempo ni en intensidad con la depleción de glutatión, ya que a la media hora de inducción hay evidencias experimentales que muestran inequívocamente depleción de glutatión como ya se ha comentado. Por tanto, la intensa depleción de glutatión que se produce en los estadios tempranos de la enfermedad no se explica por la oxidación del mismo, porque el aumento de GSSG es más tardío y de baja intensidad.

En el estudio de Neuschwander-Tetri y colaboradores se midieron los niveles de glutatión total, sin diferenciar GSH de GSSG (Neuschwander-Tetri y cols., 1992). La caída marcada de glutatión total observada por estos autores concuerda con que no existe una importante oxidación de GSH inicialmente. Si la pérdida de glutatión reducido fuese debida a una oxidación del mismo, no se produciría una caída tan marcada en el glutatión total (GSH+GSSG), puesto que se incrementaría el GSSG. No obstante, parte del GSSG formado podría perderse al salir de las células. Otros autores también han observado depleción de glutatión

pancreático sin ver aumentos asociados de GSSG (Rau y cols., 2000; Kruse y cols., 2001).

La disminución de glutatión parece por tanto independiente del estrés oxidativo que ocurre en la pancreatitis aguda, pero podría agravar el daño oxidativo al no cumplir el GSH su papel como agente antioxidante. Además, se ha sugerido que la ausencia de glutatión puede contribuir al transporte anómalo de gránulos de zimógeno y a la activación prematura de enzimas pancreáticas (Luthen y cols., 1995a; Yu y cols., 2002).

3.1. Déficit de síntesis de glutatión en la pancreatitis aguda severa.

Puesto que la oxidación no parece ser responsable de la depleción de glutatión, nos planteamos la hipótesis de que un déficit de la síntesis del mismo durante la pancreatitis aguda podría contribuir a la depleción. Como se detalla en el apartado 5.2.1.5 de la Introducción, en condiciones fisiológicas la aportación de cisteína es el paso limitante para la síntesis del tripéptido. Sin embargo, la reposición de cisteína durante la pancreatitis no es capaz de prevenir la depleción del mismo (Neuschwander-Tetri y cols., 1994), ni produce mejoría a nivel bioquímico o histológico. Por tanto, la γ -glutamil cisteína sintetasa, enzima limitante de la síntesis, podría ser la causante de la depleción y su papel todavía no se ha estudiado en la pancreatitis aguda.

Determinamos la expresión de la subunidad catalítica y de la subunidad reguladora de la enzima en el curso de la pancreatitis necrótica inducida con taurocolato, y en ambos casos encontramos que los niveles permanecen bajos durante las primeras horas, a pesar de la intensa depleción de glutatión, apreciándose un incremento significativo sólo a las seis horas de pancreatitis aguda, y sin diferencias de expresión entre la cabeza y la cola del páncreas (figuras 26 y 27). Mediante la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina hemos detectado unión de diversos factores de transcripción a los promotores de la subunidad catalítica y de la subunidad reguladora en la pancreatitis aguda necrótica. A 1 h post-inducción, en el promotor de la subunidad catalítica se produce una ligera unión de SP-1 y una unión intensa de la RNA Pol II. A las 6 h continúa la unión de la RNA Polimerasa II y se produce una unión ligera de c-Myc (figura 29A). Por otro lado, en el promotor de la subunidad reguladora se observa una unión basal de NF- κ B, c-Jun, RNA Pol II y c-Myc. A 1 h de la inducción de la pancreatitis aguda se mantiene la unión de c-Myc y de la RNA Pol II. A las 6 h se observa unión muy intensa de c-Myc y unión menor de NF- κ B y de la RNA Pol II (véase la figura 29B). La unión de los factores de transcripción estudiados podría

ayudar al reclutamiento de la RNA Pol II ya a la hora o incluso más tempranamente. Esta unión de la RNA Pol II debería suponer un aumento en la expresión del gen, tanto de la subunidad catalítica como de la subunidad reguladora, pero como hemos comentado este aumento no sucede. Podría ocurrir que la RNA Pol II permaneciese pausada en el promotor de ambos genes, pero hemos demostrado que también existe unión de la enzima a los intrones de los genes de la subunidad catalítica y de la reguladora, tanto a la hora como a las 2 h de la pancreatitis (figuras 28A y 28B), lo que inequívocamente indica que la polimerasa se encuentra transcribiendo los genes (Sandoval y cols., 2004).

El resultado final es que la cantidad de enzima GCS en páncreas permanece inalterable en el curso de la pancreatitis aguda necrótica inducida por taurocolato (figura 30). Por tanto, en respuesta a la disminución de los niveles de glutatión, el páncreas intenta elevar los niveles de GCS activando la maquinaria de transcripción, pero el aumento del mRNA sólo se produce de forma tardía y leve, y no se traduce en un incremento de la expresión proteica. Esto sugiere por un lado una falta de eficacia de la actividad transcripcional, y por otro un posible mecanismo de control postranscripcional de este mensaje en estas circunstancias. Por consiguiente, no se logra aumentar la cantidad de enzima y no se puede hacer frente a la depleción de glutatión.

Utilizando el modelo de pancreatitis edematosa inducida con ceruleína, hemos estudiado la expresión de la subunidad catalítica de la GCS y la unión de factores de transcripción al promotor de dicho gen. Los resultados muestran una inducción de la expresión de 10 veces con respecto al control (figura 32) y una unión intensa al promotor de NF- κ B, SP-1, c-Myc y RNA pol II (figura 33). Así, en la pancreatitis aguda edematosa se produce una inducción eficaz de la expresión de la GCS en respuesta a la depleción de glutatión, de forma diferente a la pancreatitis aguda necrótica donde se expresa de forma tardía e ineficaz. Por tanto, cuando la pancreatitis es grave, la capacidad de expresión de la GCS tiene el páncreas resulta completamente ineficaz y en consecuencia, el glutatión permanece disminuido más tiempo.

3.2. MAP quinasas y depleción de glutatión en la pancreatitis aguda.

A pesar de la diferente respuesta en la expresión de la GCS en los dos modelos de pancreatitis aguda –necrótica y edematosa-, el glutatión cae inicialmente de forma dramática y la expresión de la GCS no disminuye. Parece pues que la GCS no es responsable de la depleción temprana de GSH, aunque la expresión ineficaz de la GCS podría explicar que los niveles de glutatión no se

repongan de manera eficiente y se mantengan bajos durante más tiempo. Para conocer los mecanismos de depleción en el inicio de la enfermedad debemos centrarnos en las primeras respuestas celulares que se producen en la pancreatitis.

Por ello, hemos estudiado la activación de las MAP quinasas, uno de los principales mecanismos de señalización intracelular implicados en procesos de respuesta a estrés y a citoquinas, así como de muerte celular (Viguerie y cols., 1994; Wada y Penninger, 2004; Cakir y Ballinger, 2005). Las MAP quinasas fosforilan a otras proteínas y factores de transcripción amplificando la cascada inflamatoria. En la presente Tesis se ha determinado la activación de las tres grandes familias de MAP quinasas mediante *western blotting* utilizando anticuerpos específicos que se unen a las MAP quinasas bifosforiladas, ya que ésta es su forma de activación para adquirir capacidad quinasa.

Hemos observado que la MAP quinasa ERK en condiciones basales en páncreas se encuentra poco fosforilada, y sufre una fosforilación muy rápida e intensa en sus dos isoformas, ERK 1 y de ERK 2, a la media hora de la inducción de la pancreatitis con taurocolato. Posteriormente, se produce una disminución progresiva de la fosforilación hasta llegar a valores similares a los del control a las 6 h de la inducción (figuras 34A, 34B y 34C). Las dos isoformas de la MAP quinasa JNK -JNK1 y JNK2- se comportan de manera similar, pero su fosforilación basal es menor y su aumento, aunque intenso, es un poco menor que el de ERK a la media hora de inducción. Los niveles de fosforilación alcanzan la normalidad antes, sin encontrar diferencias significativas con los niveles basales a las 3 h de inducción (figuras 35A, 35B y 35C). Por último, la activación de la MAP quinasa p38 en páncreas basalmente es casi indetectable, y sufre un enorme aumento a la media hora de la inducción, que corresponde a un incremento de casi el doble respecto a las otras MAP quinasas. De nuevo, posteriormente se produce una disminución progresiva de la activación alcanzando los valores normales a las tres y 6 h post-inducción (figura 36A y 36B).

En el modelo de ceruleína es bien conocida la activación de todas las MAP quinasas en páncreas en los inicios de la inducción (Grady y cols., 1996; Wagner y cols., 1999). Recientemente, se ha descrito también activación pancreática de p38 y JNK en el modelo de taurocolato al 5% (Ren y cols., 2004). Estos autores no detectan activación temprana de JNK, aumentando sólo a las 12 h. Las discrepancias entre estos autores y nuestro trabajo pueden deberse a que ellos utilizaron un paso previo de inmunoprecipitación tras el cual realizaron *western blotting* con los anticuerpos contra las MAP quinasas fosforiladas, quizás perdiendo sensibilidad en algunos puntos.

Por tanto, en la pancreatitis aguda se produce una activación generalizada de las tres grandes familias de MAP quinasas en páncreas al inicio de la enfermedad. Esta activación podría contribuir a los procesos de inflamación y de estrés oxidativo típicos de esta enfermedad, de forma que la inhibición o modulación de la fosforilación de las MAP quinasas podría suponer una herramienta prometedora para el tratamiento etiopatogénico de la pancreatitis aguda. Siguiendo esta hipótesis, diversos grupos han realizado experimentos con resultados prometedores. Así, se han utilizado inhibidores específicos de MAP quinasas *in vivo* en la pancreatitis aguda inducida por ceruleína. La utilización de un inhibidor de MEK, que fosforila a ERK, ocasiona una mejoría en la pancreatitis con menor inflamación y daño histológico (Clemons y cols., 2002). La inhibición de JNK consigue mejores resultados que el inhibidor anterior, puesto que el inhibidor empleado (SP600125) produce una inhibición conjunta de JNK (90%) y ERK (45%) (Minutoli y cols., 2004). Sin embargo, la activación tan marcada de p38 parece que tiene un efecto protector, ya que su inhibición produce más edema y necrosis pancreática, que no es típica del modelo de pancreatitis de ceruleína (Fleischer y cols., 2001).

Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la inhibición de la producción de TNF- α con pentoxifilina junto con la inhibición de la xantina oxidasa producen una disminución de la respuesta inflamatoria sistémica, que se traduce finalmente en una disminución en la mortalidad de la pancreatitis aguda inducida por taurocolato (Pereda y cols., 2004). En este modelo de pancreatitis, se confirmó que la pentoxifilina es capaz de evitar el aumento de TNF- α en suero. Además, se observó que la administración de pentoxifilina era capaz de evitar la depleción de glutatión en páncreas a las 6 h de inducción de pancreatitis aguda, efecto que no ocurría tras la administración de oxipurinol, que inhibe la actividad xantina oxidasa.

En la presente tesis, quisimos estudiar los mecanismos implicados en la prevención con pentoxifilina de la depleción de glutatión en la pancreatitis aguda. Puesto que la depleción de glutatión se produce muy rápidamente, en ella podrían estar implicadas vías de señalización celular que actúan muy precozmente como son las MAP quinasas. Estas proteínas se activan en las fases iniciales de la pancreatitis (figuras 35, 36 y 37) y podrían estar involucradas en la rápida depleción de glutatión. Estudiamos pues si el tratamiento con pentoxifilina, con oxipurinol o con ambos fármacos a la vez, eran capaces de modular la activación de las tres familias más importantes de MAP quinasas. Tomamos como punto de estudio la media hora de inducción, puesto que era el momento de mayor activación de las MAP quinasas, y además en ese momento finaliza el tratamiento con estos fármacos, que se administran por vía intravenosa.

Mediante técnicas de *western blot* hemos observado que la activación de ERK se ve significativamente disminuida a la media hora de inducción de pancreatitis aguda tras el tratamiento con pentoxifilina, y tras el tratamiento combinado de oxipurinol y pentoxifilina. Sin embargo, la inhibición de la xantina oxidasa mediante oxipurinol no evita la activación de ERK que sucede en la pancreatitis aguda (figura 37). Para JNK hemos observado una situación similar, es decir, de nuevo la pentoxifilina así como el tratamiento combinado son capaces de inhibir su fosforilación, pero el oxipurinol se muestra ineficaz (figura 38). En cambio, la fosforilación de p38 es inhibida mediante el oxipurinol, y no por la pentoxifilina (figura 39).

Por tanto, el tratamiento combinado con ambos fármacos inhibe simultáneamente la fosforilación de las tres grandes familias de MAP quinasas. La xantina oxidasa parece entonces implicada en la activación de p38, mientras que el TNF- α jugaría un papel clave en la activación de ERK y JNK. Nuestros resultados correspondientes a p38 parecen ir en contra de otros mencionados anteriormente, ya que la inhibición selectiva de p38 se ha mostrado perjudicial a nivel local, aumentando la inflamación y la necrosis pancreática (Fleischer y cols., 2001). Los inhibidores de p38 utilizados en este trabajo de Fleischer y colaboradores son más potentes y selectivos que el oxipurinol, y no influyen sobre la capacidad de la xantina oxidasa como fuente de radicales libres. No obstante, apoya nuestros resultados la hipótesis de que la inhibición de p38 a nivel sistémico puede ser beneficiosa (Yang y cols., 1998b), y los hallazgos beneficiosos atribuidos al oxipurinol por el grupo de Closa y colaboradores (Folch y cols., 1998). La xantina oxidasa genera grandes cantidades de radical superóxido en el pulmón, dada la gran cantidad de O₂ que se encuentra en las vías aéreas (Granell y cols., 2004c). A través de la activación de p38, la xantina oxidasa podría ejercer alguno los efectos nocivos que se le han atribuido, como por ejemplo la generación y externalización de moléculas de adhesión. De hecho, la capacidad de la xantina oxidasa de activar p38 se ha descrito también en otras situaciones muy diferentes, como sucede en músculo estriado tras el ejercicio agotador. La fosforilación de p38 se revierte en este caso mediante alopurinol, que inhibe específicamente la xantina oxidasa (Gomez-Cabrera y cols., 2005).

Puesto que la pentoxifilina es capaz de evitar la depleción de glutatión además de inhibir la producción de TNF- α y la activación de ERK y JNK, podría haber una relación entre el TNF- α , estas MAP quinasas y la depleción de glutatión.

Por consiguiente, nos planteamos si la depleción de glutatión estaba relacionada con el TNF- α , y que a su vez, el TNF- α fuese el responsable de la activación de ERK y de JNK. Para responder a esta pregunta utilizamos ratones deficientes en los receptores de TNF- α y ratones deficientes en el propio TNF- α .

Puesto que en ratones es inviable la inducción de pancreatitis con taurocolato, realizamos el modelo de ceruleína como se describe en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos. A pesar de las diferencias entre ambos modelos, el modelo de ceruleína en ratones es más agresivo, produce necrosis celular y marcada depleción de glutatión en páncreas, tiene efectos sistémicos con afectación pulmonar (Niederau y cols., 1985; Fink y cols., 1997) (figura 40).

Tras la administración de ceruleína a ratones deficientes en receptores 1 o en receptores 2 del TNF- α , hemos observado una depleción de glutatión en páncreas en ambos casos similar a la que se produce en ratones controles *wild type* (figura 40). Para descartar que fuera suficiente la presencia de uno sólo de los receptores para mantener el efecto del TNF- α , decidimos estudiar la depleción de GSH en los ratones deficientes en el gen del propio TNF- α , obteniendo en este caso el mismo resultado. En efecto, la depleción de GSH que sufren los ratones *knockout* de TNF- α es marcada y no presenta diferencias con la sufrida por los ratones controles *wild type* (figura 41). Se ha descrito que en ratones deficientes del receptor tipo 1 de TNF- α se produce una pancreatitis más leve que en ratones control (Denham y cols., 1997), y los resultados se asocian a una menor respuesta sistémica, con menores valores de IL-6. Sin embargo, tras los resultados obtenidos con los ratones *knockout*, los mecanismos directamente relacionados con el TNF- α no parecen ser responsables de la depleción de glutatión pancreático. Por tanto, la pentoxifilina evita la depleción de glutatión a través de otras vías que no implican la inhibición de la producción de TNF- α . En estas otras vías las MAP quinasas podrían tener un papel importante, puesto que la pentoxifilina es capaz de inhibir la activación de ERK y JNK en páncreas tras la pancreatitis aguda (figuras 37 y 38).

Para estudiar la importancia de las MAP quinasas, y en concreto de ERK y de JNK, en la depleción de glutatión producida por taurocolato, aislamos acinos pancreáticos de rata y pusimos a punto un modelo *in vitro* de depleción de glutatión inducida por taurocolato. Esta disminución de glutatión inducida por taurocolato en células acinares se previene con un inhibidor específico de MEK, que fosforila a ERK. El inhibidor de JNK previene también, pero con menor intensidad. Por tanto, las MAP quinasas en la pancreatitis tienen un papel relevante y parecen estar involucradas en la depleción de glutatión.

Sin embargo, el modelo del cultivo primario de acinos pancreáticos puede cuestionarse, porque en el proceso de aislamiento de los acinos pancreáticos éstos se estresan y se llegan a dañar. Por ello, se produce activación de las MAP quinasas, evidenciadas por fosforilación de ERK y JNK, en el proceso de extracción y aislamiento de los acinos pancreáticos (figuras 44A y 44B). Además, nos encontramos con valores de glutatión en acinos pancreáticos recién aislados de $4,2 \pm 0,9$ nmol/mg proteína (figura 42), mientras que el páncreas fresco tiene un

valor de glutatión de $14,4 \pm 0,3$ nmol/mg proteína (Gomez-Cambronero y cols., 2000). Por estos motivos, pensamos que el modelo *in vitro* de las células acinares aisladas del páncreas de rata no es un buen modelo para estudiar la depleción de glutatión.

Las dificultades que presenta el estudio de los acinos pancreáticos, como la imposibilidad de aislar acinos sin que sufran pérdida de glutatión, la activación de las MAP quinasas basalmente y la utilización de un animal para sólo cuatro condiciones experimentales, nos forzó a la utilización de las células acinares AR42J, que proceden de cáncer exocrino de rata y suponen una buena aproximación al estudio de las células acinares pancreáticas *in vitro* (Christophe, 1994). El glutatión en estas células está en alta concentración, y a pesar de presentar variaciones según el pase en que se encuentran las células (figura 45), el efecto del taurocolato es reproducible en los diferentes pases y se pueden expresar los valores como porcentaje con respecto al control.

Para hallar unas condiciones *in vitro* que puedan asemejarse a la depleción de GSH que sucede *in vivo* en la pancreatitis aguda, estudiamos el efecto del taurocolato a diferentes concentraciones sobre los niveles de glutatión en células AR42J en cultivo (figura 46). Hemos observado que el taurocolato produce una depleción de glutatión que es dosis dependiente, encontrando una depleción de glutatión similar a la situación *in vivo* con la dosis de 0,5%. También estudiamos los efectos del taurocolato al 0,5% a diferentes tiempos de incubación (figura 47). Observamos que utilizando la concentración de 0,5% se producía una depleción de GSH de un 32% con respecto al control tras una hora de incubación. En estas condiciones ensayamos inhibidores de MAP quinasas, que podían revelar el mecanismo de depleción de la glutatión inducida por taurocolato en estas células.

Las células AR42J nos permiten ensayar numerosos inhibidores que nos clarifican el papel de ERK y JNK en la depleción de GSH. El inhibidor específico de MEK, 1/2 quinasa que fosforila a ERK, previene significativamente de nuevo la caída de glutatión que causa el taurocolato (figura 48). Utilizando un péptido permeable inhibidor específico de ERK encontramos la misma prevención, confirmando que la depleción de glutatión es dependiente de la activación de MEK y de ERK. Esta MAP quinasa fosforilaría una o varias proteínas causando depleción intracelular de glutatión. La prevención que produce el inhibidor de MEK 1/2 no varía con la adición de actinomicina D, inhibidor de la síntesis de proteínas, lo que indica que el efecto de ERK está mediado directamente por fosforilación de proteínas y no depende de la síntesis de nuevas proteínas por parte de la célula. La inhibición de JNK no previene de forma significativa la depleción de glutatión en las células AR42J. Cuando se combinan ambos inhibidores – el de MEK 1/2 y el de JNK – encontramos un efecto ligeramente mayor que al utilizar el de MEK

en solitario (figura 48), y esto puede ser debido a que el inhibidor de JNK potencia la inhibición de ERK.

De acuerdo con nuestros resultados obtenidos en las células AR42J, varios estudios han observado efectos beneficiosos en las células pancreáticas en el modelo de ceruleína tras la inhibición de ERK. Así, la inhibición *in vivo* de la vía de ERK supone menor daño histológico y menor infiltrado inflamatorio en páncreas (Clemons y cols., 2002; Minutoli y cols., 2004). Además, la inhibición conjunta de JNK y ERK disminuye la expresión de ICAM-1 y el TNF- α en el páncreas (Minutoli y cols., 2004).

La inhibición de p38 no afecta a los niveles de glutatión en las células AR42J incubadas con taurocolato. Por tanto, estos hallazgos indican que la inhibición de p38 a nivel local en páncreas no previene la depleción de glutatión en la pancreatitis aguda. Incluso se ha descrito que su inhibición puede ser perjudicial a nivel local, ya que el bloqueo de p38 *in vivo* aumenta la necrosis y los niveles de tripsina en páncreas (Fleischer y cols., 2001).

Mediante técnicas de *western blot*, hemos observado una intensa fosforilación de ERK en células AR42J incubadas con taurocolato al 0,5% durante una hora. La preincubación con PD 98059, inhibidor específico de MEK, es capaz de inhibir la fosforilación de ERK de manera significativa y marcada, pero no de forma total, lo que puede explicar que la prevención de la depleción de GSH no sea completa al utilizar este inhibidor.

3.3. Proteasas y depleción de GSH inducida por taurocolato.

Hace más de 100 años Chiari sugirió que la pancreatitis es una enfermedad debida al daño que causan las enzimas que en condiciones normales produce y secreta el páncreas (Chiari, 1896). Muchos esfuerzos se han centrado en el estudio de la activación prematura de estas enzimas. La enzima más estudiada en la pancreatitis ha sido la tripsina, que se activa de forma temprana al inicio de la enfermedad (Van Acker y cols., 2002), pero otras proteasas también han mostrado un papel importante en la pancreatitis aguda (Kruse y cols., 1999).

El estudio del efecto de la inhibición de las proteasas en la depleción de glutatión producida por el taurocolato se ha realizado utilizando un cóctel comercial que incluye inhibidores para un amplio rango de proteasas. Este cóctel evita la depleción de glutatión de manera prácticamente completa en las células AR42J. Ensayando cada componente por separado a la misma concentración que se encuentra en el cóctel, hemos observado que la prevención se debe al compuesto AEBSF. Esta molécula inhibe de forma irreversible las serín proteasas, y es menos tóxico y más soluble en agua que el clásico inhibidor de

serín proteasas PMSF, por eso se puede utilizar en células cultivadas. El AEBSF reacciona covalentemente con las serinas del centro activo de las proteasas (Schuchard y cols., 2005), inhibiendo enzimas como la tripsina, quimotripsina, calicreína, plasmina, trombina, y proteasas relacionadas con enzimas trombolíticas. También inhibe cisteín proteasas como la papaína.

Se ha descrito que el AEBSF inhibe la activación de la tripsina y la activación de NF- κ B asociada a la estimulación de las células acinares pancreáticas con ceruleína (Hietaranta y cols., 2001). Además, causa una redistribución de la F-actina que cambia la morfología de las células AR42J (Singh y cols., 2001). No obstante, se ha cuestionado el papel de las serín proteasas en la redistribución de la F-actina, puesto que otros inhibidores de serín proteasas no producen este efecto (Otani y cols., 2003). La inhibición que produce el AEBSF abarca una gama muy amplia de proteasas conocidas, pero también podría afectar a proteasas todavía desconocidas implicadas en la depleción de glutatión por taurocolato. Se ha descrito que el AEBSF tiene capacidad de inhibir la NADPH oxidasa, típica fuente de radicales libres, en macrófagos aislados ($IC_{50}=0,87$ mM) (Diatchuk y cols., 1997). Ningún otro inhibidor clásico de serín proteasas posee esta característica. No obstante, el AEBSF no es capaz de capturar radicales libres, de forma que no actúa como antioxidante (Diatchuk y cols., 1997).

Además de prevenir la depleción de glutatión, el AEBSF disminuye significativamente la mortalidad inducida por taurocolato en las células AR42J (figura 50) Ningún otro de los inhibidores de proteasas ensayados es capaz de evitar la depleción de glutatión inducida por taurocolato, a pesar de que la leupeptina y la aprotinina son también inhibidores de serín proteasas y por tanto, capaces de inhibir la tripsina, quimotripsina, calicreína, plasmina y trombina. Además, ni el inhibidor de cisteín proteasas E64, ni la pepstatina A, que es inhibidora de aspartato proteasas, ni la bestatina como inhibidora de aminopeptidasas y metaloproteinasas, tienen capacidad de revertir la depleción de glutatión. Cabe pensar por tanto que la prevención de la depleción de GSH por AEBSF no es un fenómeno asociado a la inhibición de una amplia gama de serín proteasas, sino más bien a la inhibición de una proteasa o peptidasa no afectada por otros inhibidores. Además, las proteasas más comunes, como la tripsina y la quimotripsina, se inhiben con otros componentes del cóctel, y por ello no parecen estar implicadas en la depleción de glutatión producida por taurocolato.

Los lisosomas, que en la pancreatitis aguda colocalizan con los gránulos de zimógeno (Koike y cols., 1982), podrían tener un papel en la depleción de glutatión degradándolo. Sin embargo, la preincubación con monensina, que es un ionóforo que neutraliza el pH ácido necesario para el correcto funcionamiento de las proteasas lisosomales, y 3-metiladenina, que es un inhibidor de la autofagia

celular, no afecta la disminución de los niveles de glutatión inducida por taurocolato. Por tanto, estos resultados sugieren que los lisosomas no son responsables de esta depleción en las células AR42J (figura 51). El proteasoma, que en condiciones normales degrada las proteínas ubiquitinadas en la célula, podría estar implicado en la degradación de glutatión, a pesar de que el GSH tiene un enlace γ -glutamilo resistente a las peptidasas habituales de la célula. Sin embargo, la inhibición del proteasoma mediante lactacistina no evita la depleción de glutatión (figura 51). En consecuencia, nuestros resultados apuntan a que la depleción de GSH podría deberse a una proteasa o peptidasa no lisosomal inhibida por AEBSF.

Para determinar si la depleción de glutatión inducida por taurocolato es proceso dependiente de calcio, utilizamos BAPTA-AM, un quelante específico que depleciona de calcio libre el interior de la célula evitando que aumente. Los niveles de glutatión tras la incubación con taurocolato se mantuvieron bajos en las células AR42J en presencia de BAPTA-AM, descartando el papel del calcio en la depleción de GSH. Sin embargo, el BAPTA-AM evitó la pérdida de proteína por placa, indicando que el calcio puede tener un papel primordial en la mortalidad celular inducida por taurocolato. La entrada masiva de cálcio en la célula es un fenómeno que precede a la necrosis y es uno de los más potentes inductores y mediadores de la muerte celular (Yoshioka y cols., 2000). Así, la retirada del calcio del medio o el bloqueo de los canales específicos del mismo protege a la célula frente a la muerte por necrosis.

También quisimos descartar que la pérdida de glutatión inducida por taurocolato fuera debida a la γ -glutamil transpeptidasa, única enzima descrita hasta la fecha capaz de hidrolizar el glutatión y que está situada en la cara externa de la membrana celular (Meister y Anderson, 1983). Tanto en las células AR42J como en el páncreas se observa una actividad significativa de la γ -glutamil transpeptidasa (Chobert y cols., 1996). Los experimentos realizados utilizando acivicina, inhibidor específico de la γ -glutamil transpeptidasa, no mostraron cambios significativos en los niveles de GSH deplecionados por taurocolato (figura 52), descartando por tanto un papel relevante de esta enzima en la depleción.

El estudio mediante microscopía confocal utilizando fluorocromos específicos para visualizar el contenido en glutatión, nos confirma los resultados obtenidos anteriormente con AEBSF. Se observa una disminución de la fluorescencia del monoclorobimano, que nos indica los niveles de glutatión, al tratar las células con taurocolato. La incubación con AEBSF previene la pérdida de fluorescencia dependiente de glutatión. Estos resultados concuerdan con la determinación espectrofotométrica de GSH en las células AR42J (figura 50).

3.4. Depleción de glutatión y muerte celular inducida por taurocolato.

Por último, y para estudiar la relación entre el glutatión y el tipo de muerte celular, hemos medido la actividad LDH, propia del citoplasma, en el medio de cultivo tras la incubación con taurocolato y el inhibidor AEBSF (figura 54). La comparación de la actividad LDH del medio en células incubadas con taurocolato con respecto a un lisado celular obtenido mediante sonicación, nos muestra que existe una gran liberación de LDH al medio, correspondiendo aproximadamente a un 50% del lisado celular. El AEBSF disminuye de manera significativa la actividad LDH del medio hasta un 39%. Además, el AEBSF aumenta la cantidad de proteína que queda en la placa tras la incubación con taurocolato (figura 55). Estos resultados nos demuestran que la mortalidad debida al taurocolato 0,5% es elevada, con una liberación de LDH propia de la necrosis, y que el AEBSF disminuye la muerte por necrosis inducida por taurocolato en las células AR42J.

La adición de taurocolato supone una alta mortalidad de las células AR42J por necrosis, tal y como se observa por el aumento de células teñidas con yoduro de propidio en la microscopía confocal. Sin embargo, no se aprecia tinción significativa con la anexina V que mide la externalización de la fosfatidilserina característica de la apoptosis.

En la incubación de las células AR42J con taurocolato y AEBSF se observa una disminución de la mortalidad por necrosis, confirmando lo observado midiendo la actividad LDH extracelular. Por tanto, el aumento de glutatión en las células AR42J se acompaña con menor mortalidad por necrosis. El AEBSF podría evitar la depleción de glutatión que sufrirían estas células y así aumentar la supervivencia de la célula.

De hecho, los niveles de glutatión pueden regular la muerte celular *in vitro*. Las células que son incapaces de producir glutatión mantienen su capacidad de división y supervivencia al añadir al medio de cultivo GSH, pero expresan mediadores de apoptosis y mueren tras la retirada del glutatión (El Mahdani y cols., 2000). Y está bien establecido que la depleción de glutatión sensibiliza la célula a los agentes agresores que causan mortalidad celular por necrosis (Sato y cols., 2005), además de agravar la pancreatitis (Alsfasser y cols., 2002). Asimismo, se ha observado en diferentes estudios que la depleción de glutatión aumenta la mortalidad celular por necrosis, disminuyendo la mortalidad por apoptosis tras una agresión tóxica (Troyano y cols., 2003; Vairetti y cols., 2005).

Se ha observado que la pancreatitis aguda severa está fundamentalmente asociada a la necrosis, mientras que la mortalidad celular en la pancreatitis aguda leve está asociada a la apoptosis, con un bajo porcentaje de necrosis (Kaiser y

cols., 1995; Gukovskaya y cols., 1996). La modulación de la mortalidad celular pancreática en el desarrollo de la pancreatitis aguda es de gran importancia, puesto que puede tener repercusión en la respuesta inflamatoria y por tanto, en la gravedad y posterior mortalidad de la enfermedad.

En nuestro modelo *in vitro* con células AR42J incubadas con taurocolato, se produce una intensa y temprana activación de ERK que podría fosforilar a factores de transcripción y otras proteínas. La inhibición de la vía de ERK evita en gran medida la depleción de glutatión que causa el taurocolato, independientemente de la respuesta génica de la célula. El tratamiento con AEBSF previene de forma eficaz la depleción de glutatión, disminuyendo la sensibilidad de la célula a la necrosis producida por taurocolato y aumentando la muerte por apoptosis, que conlleva menor severidad de la pancreatitis aguda.

Nuestros resultados sugieren que una proteasa o peptidasa no lisosomal calcio-independiente inhibible por AEBSF y activada por MAP quinasa es la responsable de la depleción de glutatión causada por taurocolato. La modulación de los niveles de glutatión influye sobre el tipo de mortalidad celular que produce el taurocolato, pudiendo transformar la muerte por necrosis en apoptosis, con la consiguiente reducción del componente inflamatorio.

VI-CONCLUSIONES

En el estudio de los mecanismos responsables de la depleción de glutatión en el páncreas en la pancreatitis aguda experimental, se han obtenido las siguientes conclusiones:

- 1.- En la pancreatitis aguda necrótica inducida con taurocolato en ratas se produce una depleción severa y precoz de glutatión reducido en el tejido pancreático. Esta depleción se mantiene durante al menos nueve horas tras la inducción de la pancreatitis.
- 2.- Se observa una inducción ineficaz de la γ -glutamyl cisteína sintetasa en páncreas durante la pancreatitis aguda severa que podría contribuir a la depleción mantenida de glutatión. En la pancreatitis aguda necrótica inducida con taurocolato no aumenta la expresión de las subunidades de la γ -glutamyl cisteína sintetasa durante las primeras horas, a pesar de la unión de la ARN polimerasa II tanto a los promotores como a los exones de los genes que codifican las subunidades de esta enzima. Sin embargo, en la pancreatitis aguda edematosa inducida en ratas con ceruleína se produce de forma precoz un gran aumento en la expresión de la subunidad catalítica de la γ -glutamyl cisteína sintetasa. Esta marcada inducción se debe principalmente a la unión de los factores de transcripción NF- κ B, SP-1 y c-Myc al promotor.
- 3.- En la pancreatitis aguda experimental inducida con taurocolato se produce de forma temprana un aumento en la fosforilación de las quinasas ERK 1/2, JNK y p38 en el páncreas. Posteriormente, desciende progresivamente la fosforilación de las mismas hasta alcanzar niveles semejantes al control a las seis horas tras la inducción. El tratamiento con pentoxifilina previene la fosforilación de ERK 1/2 y de JNK, mientras que el oxipurinol previene la fosforilación de p38. El tratamiento combinado con pentoxifilina y oxipurinol previene simultáneamente la fosforilación de las tres principales familias de MAP quinasas.
- 4.- El TNF- α no tiene un papel significativo en la depleción de glutatión en la pancreatitis aguda dado que la depleción de glutatión asociada a la pancreatitis aguda inducida por ceruleína se produce tanto en ratones control *wild type* como en ratones *knockout* de TNF- α o de los receptores de TNF- α .

- 5.- La inhibición de la vía de ERK previene la depleción de glutatión inducida con taurocolato *in vitro* tanto en células acinares como en células AR42J. No obstante, JNK y p38 no influyen significativamente en esta depleción de glutatión.
- 6.- El inhibidor de proteasas AEBSF previene la depleción de glutatión inducida por taurocolato en células AR42J. Sin embargo, las proteasas lisosomales, el proteasoma, el calcio y la γ -glutamil transpeptidasa no juegan un papel significativo en la depleción de glutatión.
- 7.- El AEBSF, inhibidor de la depleción de glutatión, disminuye la necrosis inducida por taurocolato en células AR42J, aumentando la muerte celular por apoptosis.

En base a estas conclusiones, nuestros resultados sugieren que la depleción de glutatión en páncreas en la pancreatitis aguda se debe a una proteasa o peptidasa no lisosomal dependiente de MAP quinasas, no dependiente de calcio e inhibible por AEBSF.

VII-BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., A. Lichtman and J. Pober (1994). Cytokines. *Cellular and molecular immunology*. L. A. Abbas AK, Pober JS. Philadelphia, WB Saunders Co: 240-260.
- Acioli, J. M., M. Isobe and S. Kawasaki (1997). "Early complement system activation and neutrophil priming in acute pancreatitis: participation of trypsin." *Surgery* 122(5): 909-17.
- Adam-Klages, S., R. Schwandner, S. Luschen, S. Ussat, D. Kreder and M. Kronke (1998). "Caspase-mediated inhibition of human cytosolic phospholipase A2 during apoptosis." *J Immunol* 161(10): 5687-94.
- Aho, H. J., S. M. Koskensalo and T. J. Nevalainen (1980). "Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis." *Scand J Gastroenterol* 15(4): 411-6.
- Aho, H. J., T. J. Nevalainen and A. J. Aho (1983). "Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection." *Eur Surg Res* 15(1): 28-36.
- Albertini, R., S. Rindi, A. Passi, A. Bardoni, R. Salvini, G. Pallavicini and G. De Luca (1996). "The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation." *Arch. Biochem. Biophys.* 327(2): 207-214.
- Aleman, V. and P. Handler (1967). "Dihydroorotate dehydrogenase. I. General properties." *J Biol Chem* 242(18): 4087-96.
- Allman, D., J. A. Punt, D. J. Izon, J. C. Aster and W. S. Pear (2002). "An invitation to T and more: notch signaling in lymphopoiesis." *Cell* 109 Suppl: S1-11.
- Alsfasser, G., M. Gock, L. Herzog, M. M. Gebhard, C. Herfarth, E. Klar and J. Schmidt (2002). "Glutathione depletion with L-buthionine-(S,R)-sulfoximine demonstrates deleterious effects in acute pancreatitis of the rat." *Dig Dis Sci* 47(8): 1793-9.
- Altavilla, D., C. Famulari, M. Passaniti, M. Galeano, A. Macri, P. Seminara, L. Minutoli, H. Marini, M. Calo, F. S. Venuti, M. Esposito and F. Squadrito (2003). "Attenuated cerulein-induced pancreatitis in nuclear factor-kappaB-deficient mice." *Lab Invest* 83(12): 1723-32.
- Altimari, A. F., R. A. Prinz, D. W. Leutz, L. Sandberg, P. M. Kober and R. M. Raymond (1986). "Myocardial depression during acute pancreatitis: fact or fiction?" *Surgery* 100(4): 724-31.
- Amaya, Y., K. Yamazaki, M. Sato, K. Noda and T. Nishino (1990). "Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin." *J Biol Chem* 265(24): 14170-5.
- Ames, B. N. (1983). "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases." *Science* 221: 1256-1264.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga and T. M. Hagen (1993). "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7915-7922.
- Aoki, H., P. M. Kang, J. Hampe, K. Yoshimura, T. Noma, M. Matsuzaki and S. Izumo (2002). "Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes." *J Biol Chem* 277(12): 10244-50.
- Aparisi, L. and F. Raga (1991). "Epidemiología de la pancreatitis aguda." *Gastroenterol Hepatol* 14: 161-170.
- Appelros, S. and A. Borgstrom (1999). "Incidence, aetiology and mortality rate of acute pancreatitis over 10 years in a defined urban population in Sweden." *Br J Surg* 86(4): 465-70.
- Artaza, T., A. Talavera, M. Legaz, R. Gómez, J. Martínez and J. Martínez (1994). "Epidemiologic aspects of 116 acute pancreatitis prospectively studied." *Rev Esp Enf Dig* 85: 27-30.

- Aruoma, O. I. and B. Halliwell (1989). "Inactivation of alpha 1-antiproteinase by hydroxyl radicals. The effect of uric acid." *FEBS Lett* 244(1): 76-80.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, M. J. Laughton, G. J. Quinlan and J. M. Gutteridge (1989). "The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex." *Biochem J* 258(2): 617-20.
- Asensi, M., J. Sastre, F. V. Pallardo, J. Garcia de la Asuncion, J. M. Estrela and J. Vina (1994). "A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples." *Analytical Biochemistry* 217(2): 323-328.
- Asensi, M., J. Sastre, F. V. Pallardo, A. Lloret, M. Lehner, J. Garcia-de-la Asuncion and J. Vina (1999). "Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage." *Methods Enzymol* 299: 267-76.
- Aust, S. D., C. F. Chignell, T. M. Bray, B. Kalyanaraman and R. P. Mason (1993). "Free radicals in toxicology." *Toxicol Appl Pharmacol* 120(2): 168-78.
- Austin, J. L., C. Roberts, M. J. Rosenholtz and H. A. Reber (1980). "Effects of partial duct obstruction and drainage of pancreatic function." *J Surg Res* 28(5): 426-33.
- Babior, B. M. (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes." *N. Engl. J. Med.* 298: 659-668.
- Baert, F. J., G. R. D'Haens, M. Peeters, M. I. Hiele, T. F. Schaible, D. Shealy, K. Geboes and P. J. Rutgeerts (1999). "Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis." *Gastroenterology* 116(1): 22-8.
- Baeuerle, P. A. and T. Henkel (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." *Annu Rev Immunol* 12: 141-79.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." *Annu Rev Immunol* 14: 649-83.
- Ballidin, G. (1987). Release of vasoactive substances in ascites and blood in acute pancreatitis. *Acute pancreatitis: research and clinical management*. H. G. Beger and M. Büchler. Berlin, Springer-Verlag: 63-70.
- Balthazar, E. J., D. L. Robinson, A. J. Megibow and J. H. Ranson (1990). "Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis." *Radiology* 174(2): 331-6.
- Banks, P. A. (2002). "Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis." *Gastrointest Endosc* 56(6 Suppl): S226-30.
- Bannai, S. (1984). "Transport of cystine and cysteine in mammalian cells." *Biochim Biophys Acta* 779(3): 289-306.
- Bannai, S., T. Ishii, A. Takada and T. Noriko (1989). Regulation of glutathione level by amino acid transport. *Glutathione centennial*. N. Taniguchi, T. Higashi, Y. Sakamoto and A. Meister. San Diego, Academic Press: 407-421.
- Becker, B. F. (1993). "Towards the physiological function of uric acid." *Free Radic Biol Med* 14(6): 615-31.
- Becker, P. B. and W. Horz (2002). "ATP-dependent nucleosome remodeling." *Annu Rev Biochem* 71: 247-73.
- Beckingham, I. J. and P. C. Bornman (2001). "ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system. Acute pancreatitis." *Bmj* 322(7286): 595-8.
- Beger, H. G., R. Bittner, M. Buchler, W. Hess and J. E. Schmitz (1986). "Hemodynamic data pattern in patients with acute pancreatitis." *Gastroenterology* 90(1): 74-9.
- Bellomo, C., S. A. Jewel, H. Thor and S. Orrenius (1982). "Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6842-6846.

- Bellomo, G., M. Vairetti, L. Stivala, F. Mirabelli, P. Richelmi and S. Orrenius (1992). "Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4412-6.
- Benboubetra, M., A. Gleeson, C. P. Harris, J. Khan, L. Arrar, D. Brennan, J. Reid, J. D. Reckless and R. Harrison (1997). "Circulating anti-(xanthine oxidoreductase) antibodies in healthy human adults." *Eur J Clin Invest* 27(7): 611-9.
- Bendich, A., L. J. Machlin, O. Scandurra, G. W. Burton and D. D. M. Wayner (1986). "The antioxidant role of vitamin C." *Free radical biology and medicine* 2: 419-444.
- Benzi, G. and A. Moretti (1995). "Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system." *Free Rad. Biol. Med.* 19(1): 77-101.
- Bergmann, M., L. Hart, M. Lindsay, P. J. Barnes and R. Newton (1998). "IkappaBalpha degradation and nuclear factor-kappaB DNA binding are insufficient for interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha-induced kappaB-dependent transcription. Requirement for an additional activation pathway." *J Biol Chem* 273(12): 6607-10.
- Bhatia, M., A. K. Saluja, B. Hofbauer, H. S. Lee, J. L. Frossard and M. L. Steer (1998). "The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasive model of acute pancreatitis-associated lung injury." *Int J Pancreatol* 24(2): 77-83.
- Bhatia, M. (2004). "Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286(2): G189-96.
- Biffi, W. L., E. E. Moore, F. A. Moore and V. M. Peterson (1996). "Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation?" *Ann Surg* 224(5): 647-64.
- Blinman, T. A., I. Gukovsky, M. Mouria, V. Zaninovic, E. Livingston, S. J. Pandol and A. S. Gukovskaya (2000). "Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase." *Am J Physiol Cell Physiol* 279(6): C1993-2003.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." *Nature* 411(6835): 355-65.
- Bondy, S. C. (1992). "Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage." *Neurotoxicology* 13(1): 87-100.
- Boon, P., J. de Reuck, E. Achten and J. de Bleecker (1991). "Pancreatic encephalopathy. A case report and review of the literature." *Clin Neurol Neurosurg* 93(2): 137-41.
- Boone, E., T. Vanden Berghe, G. Van Loo, G. De Wilde, N. De Wael, D. Vercaemmen, W. Fiers, G. Haegeman and P. Vandenabeele (2000). "Structure/Function analysis of p55 tumor necrosis factor receptor and fas-associated death domain. Effect on necrosis in L929sA cells." *J Biol Chem* 275(48): 37596-603.
- Boulton, T. G., G. D. Yancopoulos, J. S. Gregory, C. Slaughter, C. Moomaw, J. Hsu and M. H. Cobb (1990). "An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control." *Science* 249(4964): 64-7.
- Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb and G. D. Yancopoulos (1991). "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." *Cell* 65(4): 663-75.
- Boveris, A., N. Oshino and B. Chance (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." *Biochem. J.* 128: 617-630.
- Boveris, A. and B. C. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." *Biochem J* 143: 707-716.
- Boxer, L. M. and C. V. Dang (2001). "Translocations involving c-myc and c-myc function." *Oncogene* 20(40): 5595-610.

- Bradley, E. L., 3rd, F. Murphy and C. Ferguson (1989). "Prediction of pancreatic necrosis by dynamic pancreatography." *Ann Surg* 210(4): 495-503; discussion 503-4.
- Bradley, E. L., 3rd (1993). "A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992." *Arch Surg* 128(5): 586-90.
- Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." *Free Rad. Biol. Med.* 18(6): 1033-1077.
- Brigelius, R., C. Muckel, T. P. M. Akerbom and H. Sies (1983). "Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide." *Biochem Pharmacol* 32: 2529-2534.
- Brivanlou, A. H. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Signal transduction and the control of gene expression." *Science* 295(5556): 813-8.
- Büchler, M., P. Malfertheiner, W. Uhl, J. Scholmerich, F. Stockmann, G. Adler, W. Gaus, K. Rolle and H. G. Beger (1993). "Gabexate mesilate in human acute pancreatitis. German Pancreatitis Study Group." *Gastroenterology* 104(4): 1165-70.
- Buter, A., C. W. Imrie, C. R. Carter, S. Evans and C. J. McKay (2002). "Dynamic nature of early organ dysfunction determines outcome in acute pancreatitis." *Br J Surg* 89(3): 298-302.
- Cadenas, E., A. Boveris, C. I. Ragan and A. O. M. Stoppani (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 248-257.
- Cai, J., Z. Z. Huang and S. C. Lu (1997). "Differential regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression." *Biochem J* 326 (Pt 1): 167-72.
- Cakir, Y. and S. W. Ballinger (2005). "Reactive species-mediated regulation of cell signaling and the cell cycle: the role of MAPK." *Antioxid Redox Signal* 7(5-6): 726-40.
- Capdevila, J., N. Chacos, J. Werringer, R. A. Prough and R. W. Estabrook (1981). "Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(9): 5362-6.
- Carballo, F. (1990). "Estudio multicéntrico hospitalario ACAD sobre evaluación pronóstica precoz en pancreatitis aguda: casuística y aspectos epidemiológicos." *Rev ACAD* 6: 96-100.
- Carballo, F. and J. Mateos (2002). Epidemiología y etiología de la pancreatitis aguda. *Tratado de páncreas exocrino*. S. Navarro, M. Pérez-Mateo and L. Guarner. Barcelona, Ed. J&C Ediciones Médicas S. L.: 117-118.
- Chance, B., H. Sies and A. Boveris (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." *Physiol Rev* 59(3): 527-605.
- Chautan, M., G. Chazal, F. Cecconi, P. Gruss and P. Golstein (1999). "Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway." *Curr Biol* 9(17): 967-70.
- Cheeseman, K. H. and T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." *Br. Med. Bull.* 49(3): 588-603.
- Chen, C. C., S. S. Wang, F. Y. Lee, F. Y. Chang and S. D. Lee (1999). "Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis." *Am J Gastroenterol* 94(1): 213-8.
- Chen, Z., J. Hagler, V. J. Palombella, F. Melandri, D. Scherer, D. Ballard and T. Maniatis (1995). "Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway." *Genes Dev* 9(13): 1586-97.
- Chiari, H. (1896). "Über selbstverdaung des Menschlichen Pancreas." *Zeitschrift für Heilkunde* 17: 69-96.

- Chobert, M. N., G. Grondin, A. Brouillet, Y. Laperche and A. R. Beaudoin (1996). "Control of gamma-glutamyl transpeptidase expression by glucocorticoids in the rat pancreas. Correlation with granule formation." *J Biol Chem* 271(21): 12431-7.
- Christophe, J. (1994). "Pancreatic tumoral cell line AR42J: an ampicrine model." *Am J Physiol* 266(6 Pt 1): G963-71.
- Clavien, P. A., H. Hauser, P. Meyer and A. Rohner (1988). "Value of contrast-enhanced computerized tomography in the early diagnosis and prognosis of acute pancreatitis. A prospective study of 202 patients." *Am J Surg* 155(3): 457-66.
- Clemons, A. P., D. M. Holstein, A. Galli and C. Saunders (2002). "Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat is significantly ameliorated by treatment with MEK1/2 inhibitors U0126 and PD98059." *Pancreas* 25(3): 251-9.
- Closa, D., J. Rosello-Catafau, G. Hotter, O. Bulbena, L. Fernandez-Cruz and E. Gelpi (1993). "Cyclooxygenase and lipoxygenase metabolism in sodium taurocholate induced acute hemorrhagic pancreatitis in rats." *Prostaglandins* 45(4): 315-22.
- Closa, D., O. Bulbena, G. Hotter, J. Rosello-Catafau, L. Fernandez-Cruz and E. Gelpi (1994). "Xanthine oxidase activation in cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in rats." *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 102(3): 167-70.
- Closa, D., M. Bardaji, G. Hotter, N. Prats, E. Gelpi, L. Fernandez-Cruz and J. Rosello-Catafau (1996). "Hepatic involvement in pancreatitis-induced lung damage." *Am J Physiol* 270(1 Pt 1): G6-13.
- Closa, D., L. Sabater, L. Fernández-Cruz, N. Prats, E. Gelpi and J. Roselló-Catafau (1999). "Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver." *Ann Surg* 229(2): 230-6.
- Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki and J. S. Gutkind (1995). "The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway." *Cell* 81(7): 1137-46.
- Crabtree, G. R. and E. N. Olson (2002). "NFAT signaling: choreographing the social lives of cells." *Cell* 109 Suppl: S67-79.
- Cutler, R. G. (1984). "Urate and ascorbate: their possible roles as antioxidants in determining longevity of mammalian species." *Arch Gerontol Geriatr* 3(4): 321-48.
- Czako, L., T. Takacs, I. S. Varga, D. Q. Hai, L. Tizslavicz, P. Hegyi, Y. Mandi, B. Matkovics and J. Lonovics (2000). "The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis: inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin." *J Physiol Paris* 94(1): 43-50.
- Dabrowski, A., A. Gabryelewicz, U. Wereszczynska-Siemiakowska and L. Chyczewski (1988). "Oxygen-derived free radicals in cerulein-induced acute pancreatitis." *Scand J Gastroenterol* 23(10): 1245-9.
- Dabrowski, A., T. Grady, C. D. Logsdon and J. A. Williams (1996). "Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo." *J Biol Chem* 271(10): 5686-90.
- Dabrowski, A., C. Boguslowicz, M. Dabrowska, I. Tribillo and A. Gabryelewicz (2000a). "Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells." *Pancreas* 21(4): 376-84.
- Dabrowski, A., I. Tribillo, M. I. Dabrowska, U. Wereszczynska-Siemiakowska and A. Gabryelewicz (2000b). "Activation of mitogen-activated protein kinases in different models of pancreatic acinar cell damage." *Z Gastroenterol* 38(6): 469-81.
- Darnell, J. E., Jr. (1997). "STATs and gene regulation." *Science* 277(5332): 1630-5.

- Davies, K. J., A. Sevanian, S. F. Muakkassah-Kelly and P. Hochstein (1986). "Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid." *Biochem J* 235(3): 747-54.
- Davies, K. J. A. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects." *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.
- Davis, M. D., D. E. Edmondson and F. Muller (1984). "³¹P nuclear magnetic resonance and chemical studies of the phosphorus residues in bovine milk xanthine oxidase." *Eur J Biochem* 145(2): 237-43.
- De Capoa, A., M. Ferraro, P. Lavia, F. Pelliccia and A. Finazzi-Agro (1982). "Silver staining of the nucleolus organizer regions (NOR) requires clusters of sulfhydryl groups." *J Histochem Cytochem* 30(9): 908-11.
- de la Asuncion, J. G., M. L. del Olmo, J. Sastre, A. Millan, A. Pellin, F. V. Pallardo and J. Vina (1998). "AZT treatment induces molecular and ultrastructural oxidative damage to muscle mitochondria. Prevention by antioxidant vitamins." *J Clin Invest* 102(1): 4-9.
- Del Maestro, R., H. H. Thaw, J. Bjork, M. Planker and K. E. Arfors (1980). "Free radicals as mediators of tissue injury." *Acta Physiol Scand Suppl* 492: 43-57.
- Demols, A., J. L. Van Laethem, E. Quertinmont, F. Legros, H. Louis, O. Le Moine and J. Deviere (2000). "N-acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice." *Pancreas* 20(2): 161-9.
- Denham, W., J. Yang, G. Fink, D. Denham, G. Carter, K. Ward and J. Norman (1997). "Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis." *Gastroenterology* 113(5): 1741-6.
- Denham, W. and J. Norman (1999). "The potential role of therapeutic cytokine manipulation in acute pancreatitis." *Surg Clin North Am* 79(4): 767-81.
- DeRey-Pailhade, J. (1888). "Sur un corps d'origine organique hydrogenant le soufre a froid." *CR Acad Sci* 106: 1683-1684.
- Dervenis, C. (2000). "Assessments of severity and management of acute pancreatitis based on the Santorini Consensus Conference report." *Jop* 1(4): 178-82.
- Di Lisa, F., R. Menabo, M. Canton, M. Barile and P. Bernardi (2001). "Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart." *J Biol Chem* 276(4): 2571-5.
- Diatchuk, V., O. Lotan, V. Koshkin, P. Wikstroem and E. Pick (1997). "Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds." *J Biol Chem* 272(20): 13292-301.
- Dib, M., X. Zhao, X. D. Wang and R. Andersson (2002). "Role of mast cells in the development of pancreatitis-induced multiple organ dysfunction." *Br J Surg* 89(2): 172-8.
- Dixon, M. and S. Thurlow (1924). *Biochem J* 18: 989-992.
- Dolphin, D. (1988). The generation of radicals during the normal and abnormal functioning of cytochromes P450. *Oxygen radicals in biology and medicine*. M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag, Ed. Plenum Press.: 491-500.
- Dong, C., R. J. Davis and R. A. Flavell (2002). "MAP kinases in the immune response." *Annu Rev Immunol* 20: 55-72.
- Doroshov, J. H. and K. J. Davies (1983). "Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide, and neocarzinostatin." *Biochem Pharmacol* 32(19): 2935-9.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* 82(1): 47-95.

- Du, W. D., Z. R. Yuan, J. Sun, J. X. Tang, A. Q. Cheng, D. M. Shen, C. J. Huang, X. H. Song, X. F. Yu and S. B. Zheng (2003). "Therapeutic efficacy of high-dose vitamin C on acute pancreatitis and its potential mechanisms." *World J Gastroenterol* 9(11): 2565-9.
- Duan, R. D. and J. A. Williams (1994). "Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini." *Am J Physiol* 267(3 Pt 1): G401-8.
- Duan, R. D., C. F. Zheng, K. L. Guan and J. A. Williams (1995). "Activation of MAP kinase kinase (MEK) and Ras by cholecystokinin in rat pancreatic acini." *Am J Physiol* 268(6 Pt 1): G1060-5.
- Dutta, S. K., C. D. Ting and L. L. Lai (1997). "Study of prevalence, severity, and etiological factors associated with acute pancreatitis in patients infected with human immunodeficiency virus." *Am J Gastroenterol* 92(11): 2044-8.
- Edelson, J. D., P. Vadas, J. Villar, J. B. Mullen and W. Pruzanski (1991). "Acute lung injury induced by phospholipase A2. Structural and functional changes." *Am Rev Respir Dis* 143(5 Pt 1): 1102-9.
- El Mahdani, N. E., M. Ameyar, Z. Cai, O. Colard, J. Masliyah and S. Chouaib (2000). "Resistance to TNF-induced cytotoxicity correlates with an abnormal cleavage of cytosolic phospholipase A2." *J Immunol* 165(12): 6756-61.
- Enroth, C., B. T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino and E. F. Pai (2000). "Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 10723-8.
- Esteve, J. M., J. Mompo, J. Garcia de la Asuncion, J. Sastre, M. Asensi, J. Boix, J. R. Vina, J. Vina and F. V. Pallardo (1999). "Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro." *Faseb J* 13(9): 1055-64.
- Estrela, J. M., F. Gil, J. M. Vila and J. Vina (1988). "Alpha-adrenergic modulation of glutathione metabolism in isolated rat hepatocytes." *Am J Physiol* 255(6 Pt 1): E801-5.
- Ethridge, R. T., D. H. Chung, M. Slogoff, R. A. Ehlers, M. R. Hellmich, S. Rajaraman, H. Saito, T. Uchida and B. M. Evers (2002). "Cyclooxygenase-2 gene disruption attenuates the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury." *Gastroenterology* 123(4): 1311-22.
- Feddersen, C. O., S. Willemer, W. Karges, A. Puchner, G. Adler and P. V. Wichert (1991). "Lung injury in acute experimental pancreatitis in rats. II. Functional studies." *Int J Pancreatol* 8(4): 323-31.
- Fenton, H. J. H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." *J. Chem. Soc. Trans.* 65: 899-910.
- Fernandez-Checa, J. C. and N. Kaplowitz (1990). "The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis." *Anal Biochem* 190(2): 212-9.
- Fernandez-Checa, J. C., C. Garcia-Ruiz, M. Ookhtens and N. Kaplowitz (1991). "Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. Tracer kinetic studies in vitro and in vivo and susceptibility to oxidant stress." *J Clin Invest* 87(2): 397-405.
- Fernandez-Checa, J. C., M. Ookhtens and N. Kaplowitz (1993). "Selective induction by phenobarbital of the electrogenic transport of glutathione and organic anions in rat liver canalicular membrane vesicles." *J Biol Chem* 268(15): 10836-41.
- Ferreira, L., N. Perez-Gonzalez, M. Llanillo, J. J. Calvo and C. Sanchez-Bernal (2002). "Acute pancreatitis decreases pancreas phospholipid levels and increases susceptibility to lipid peroxidation in rat pancreas." *Lipids* 37(2): 167-71.
- Ferrer, J. V., E. Gasco, J. Sastre, F. V. Pallardo, M. Asensi and J. Vina (1990). "Age-related changes in glutathione synthesis in the eye lens." *Biochem J* 269(2): 531-4.
- Fink, G., J. Yang, G. Carter and J. Norman (1997). "Acute pancreatitis-induced enzyme release and necrosis are attenuated by IL-1 antagonism through an indirect mechanism." *J Surg Res* 67(1): 94-7.

- Fink, G. W. and J. G. Norman (1996). "Intrapancreatic interleukin-1beta gene expression by specific leukocyte populations during acute pancreatitis." *J Surg Res* 63(1): 369-73.
- Fink, G. W. and J. G. Norman (1997). "Specific changes in the pancreatic expression of the interleukin 1 family of genes during experimental acute pancreatitis." *Cytokine* 9(12): 1023-7.
- Finkelstein, J. D. (2000). "Homocysteine: a history in progress." *Nutr Rev* 58(7): 193-204.
- Florentino, D. F., A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard and A. O'Garra (1991). "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages." *J Immunol* 147(11): 3815-22.
- Fleischer, F., R. Dabew, B. Goke and A. C. Wagner (2001). "Stress kinase inhibition modulates acute experimental pancreatitis." *World J Gastroenterol* 7(2): 259-65.
- Foitzik, T., G. Eibl, H. G. Hotz, J. Faulhaber, M. Kirchengast and H. J. Buhr (2000). "Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates." *Surgery* 128(3): 399-407.
- Folch, E., E. Gelpi, J. Rosello-Catafau and D. Closa (1998). "Free radicals generated by xanthine oxidase mediate pancreatitis-associated organ failure." *Dig Dis Sci* 43(11): 2405-10.
- Folch, E., A. Salas, J. Panes, E. Gelpi, J. Rosello-Catafau, D. C. Anderson, S. Navarro, J. M. Pique, L. Fernandez-Cruz and D. Closa (1999). "Role of P-selectin and ICAM-1 in pancreatitis-induced lung inflammation in rats: significance of oxidative stress." *Ann Surg* 230(6): 792-8; discussion 798-9.
- Folch, E., N. Prats, G. Hotter, S. Lopez, E. Gelpi, J. Rosello-Catafau and D. Closa (2000a). "P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis." *Dig Dis Sci* 45(8): 1535-44.
- Folch, E., A. Salas, N. Prats, J. Panes, J. M. Pique, E. Gelpi, J. Rosello-Catafau and D. Closa (2000b). "H₂O₂ and PARS mediate lung P-selectin upregulation in acute pancreatitis." *Free Radic Biol Med* 28(8): 1286-94.
- Folch, E. and D. Closa (2001). "[New pathogenic concepts of pulmonary lesions in acute pancreatitis]." *Gastroenterol Hepatol* 24(6): 312-7.
- Folch, E., A. Serrano, L. Sabater, E. Gelpi, J. Rosello-Catafau and D. Closa (2001). "Soluble receptors released during acute pancreatitis interfere with the detection of tumor necrosis factor-alpha." *Crit Care Med* 29(5): 1023-6.
- Foltz, I. N., J. C. Lee, P. R. Young and J. W. Schrader (1997). "Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway." *J Biol Chem* 272(6): 3296-301.
- Forstrom, J. W., J. J. Zakowski and A. L. Tappel (1978). "Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine." *Biochemistry*. 17: 2639-2644.
- Foster, R. E. and R. W. Estabrook (1993). "Is oxygen an essential nutrient?" *Annu. Rev. Nutr* 13: 383-403.
- Freeman, B. A. and J. Crapo (1982). "Biology of disease: Free radicals and tissue injury." *Lab. Invest.* 47: 412-426.
- Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action." *Am. J. Med.* 97(3A): 5S-13S.
- Fridovich, I. (1974). "Superoxide dismutases." *Adv Enzimol* 41: 35-97.
- Fridovich, I. (1978). "Superoxide dismutases: defence against endogenous superoxide radical." *Ciba Found Symp*(65): 77-93.
- Fridovich, I. (1997). "Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters." *J Biol Chem* 272(30): 18515-7.

- Frossard, J. L., A. Saluja, L. Bhagat, H. S. Lee, M. Bhatia, B. Hofbauer and M. L. Steer (1999). "The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury." *Gastroenterology* 116(3): 694-701.
- Fry, D. E. (1988). "Multiple system organ failure." *Surg Clin North Am* 68(1): 107-22.
- Fu, K., M. P. Sarras, Jr., R. C. De Lisle and G. K. Andrews (1997). "Expression of oxidative stress-responsive genes and cytokine genes during caerulein-induced acute pancreatitis." *Am J Physiol* 273(3 Pt 1): G696-705.
- Fukunaga, R. and T. Hunter (1997). "MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates." *Embo J* 16(8): 1921-33.
- Gabai, V. L., A. B. Meriin, J. A. Yaglom, J. Y. Wei, D. D. Mosser and M. Y. Sherman (2000). "Suppression of stress kinase JNK is involved in HSP72-mediated protection of myogenic cells from transient energy deprivation. HSP72 alleviates the stress-induced inhibition of JNK dephosphorylation." *J Biol Chem* 275(48): 38088-94.
- Garcia-Ruiz, C., J. C. Fernandez-Checa and N. Kaplowitz (1992). "Bidirectional mechanism of plasma membrane transport of reduced glutathione in intact rat hepatocytes and membrane vesicles." *J Biol Chem* 267(31): 22256-64.
- Garcia-Ruiz, C., A. Morales, A. Colell, J. Rodes, J. R. Yi, N. Kaplowitz and J. C. Fernandez-Checa (1995). "Evidence that the rat hepatic mitochondrial carrier is distinct from the sinusoidal and canalicular transporters for reduced glutathione. Expression studies in *Xenopus laevis* oocytes." *J Biol Chem* 270(27): 15946-9.
- Gatell, J., F. Galindo, J. Camp and J. Millá (1979). "Pancreatitis aguda en el área de Barcelona. Consideraciones epidemiológicas." *Gastroenterol Hepatol* 2: 136-140.
- Ghio, A. J., T. P. Kennedy, J. Stonehuerner, J. D. Carter, K. A. Skinner, D. A. Parks and J. R. Hoidal (2002). "Iron regulates xanthine oxidase activity in the lung." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(3): L563-72.
- Giler, S., O. Sperling, S. Brosh, I. Urca and A. De Vries (1975). "Serum xanthine oxidase in jaundice." *Clin Chim Acta* 63(1): 37-40.
- Gipp, J. J., C. Chang and R. T. Mulcahy (1992). "Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human liver gamma-glutamylcysteine synthetase." *Biochem Biophys Res Commun* 185(1): 29-35.
- Giroir, B. P. (1999). "Pancreatitis, cytokines, and SIRS: deja vu all over again?" *Crit Care Med* 27(4): 680-1.
- Gloor, B., T. A. Blinman, D. A. Rigberg, K. E. Todd, J. S. Lane, O. J. Hines and H. A. Reber (2000). "Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats." *Pancreas* 21(4): 414-20.
- Gomez-Cabrera, M. C., C. Borrás, F. V. Pallardo, J. Sastre, L. L. Ji and J. Vina (2005). "Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats." *J Physiol* 567(Pt 1): 113-20.
- Gomez-Cambronero, L., B. Camps, J. G. de La Asuncion, M. Cerda, A. Pellin, F. V. Pallardo, J. Calvete, J. H. Sweiry, G. E. Mann, J. Vina and J. Sastre (2000). "Pentoxifylline ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide." *J Pharmacol Exp Ther* 293(2): 670-6.
- Gough, D. B., B. Boyle, W. P. Joyce, C. P. Delaney, K. F. McGeeney, T. F. Gorey and J. M. Fitzpatrick (1990). "Free radical inhibition and serial chemiluminescence in evolving experimental pancreatitis." *Br J Surg* 77(11): 1256-9.

- Grady, T., A. Dabrowski, J. A. Williams and C. D. Logsdon (1996). "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): 1-7.
- Granell, S., O. Bulbena, M. Genesca, L. Sabater, J. Sastre, E. Gelpi and D. Closa (2004a). "Mobilization of xanthine oxidase from the gastrointestinal tract in acute pancreatitis." *BMC Gastroenterol* 4(1): 1.
- Granell, S., J. Pereda, L. Gomez-Cambronero, N. Cassinello, L. Sabater, D. Closa and J. Sastre (2004b). "Circulating TNF-alpha and its soluble receptors during experimental acute pancreatitis." *Cytokine* 25(4): 187-91.
- Granell, S., A. Serrano-Mollar, E. Folch-Puy, D. Navajas, R. Farre, O. Bulbena and D. Closa (2004c). "Oxygen in the alveolar air space mediates lung inflammation in acute pancreatitis." *Free Radic Biol Med* 37(10): 1640-7.
- Green, D. R. (2003). "Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system." *Immunol Rev* 193: 5-9.
- Greenwald, R. A. and W. W. Moy (1980). "Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid." *Arthritis Rheum.* 23: 455-463.
- Grewal, H. P., M. Kotb, A. M. el Din, M. Ohman, A. Salem, L. Gaber and A. O. Gaber (1994a). "Induction of tumor necrosis factor in severe acute pancreatitis and its subsequent reduction after hepatic passage." *Surgery* 115(2): 213-21.
- Grewal, H. P., A. Mohey el Din, L. Gaber, M. Kotb and A. O. Gaber (1994b). "Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF-alpha polyclonal antibody." *Am J Surg* 167(1): 214-8; discussion 218-9.
- Griffith, O. W. and A. Meister (1979). "Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(11): 5606-10.
- Griffith, O. W. and A. Meister (1985). "Origin and turnover of mitochondrial glutathione." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(14): 4668-72.
- Gross, V., R. Andreesen, H. G. Leser, M. Ceska, E. Liehl, M. Lausen, E. H. Farthmann and J. Scholmerich (1992). "Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis." *Eur J Clin Invest* 22(3): 200-3.
- Guice, K. S., D. E. Miller, K. T. Oldham, C. M. Townsend, Jr. and J. C. Thompson (1986). "Superoxide dismutase and catalase: a possible role in established pancreatitis." *Am J Surg* 151(1): 163-9.
- Guice, K. S., K. T. Oldham, D. G. Remick, S. L. Kunkel and P. A. Ward (1991). "Anti-tumor necrosis factor antibody augments edema formation in caerulein-induced acute pancreatitis." *J Surg Res* 51(6): 495-9.
- Gukovskaya, A. S., P. Perkins, V. Zaninovic, D. Sandoval, R. Rutherford, T. Fitzsimmons, S. J. Pandol and S. Poucell-Hatton (1996). "Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat." *Gastroenterology* 110(3): 875-84.
- Gukovskaya, A. S., I. Gukovsky, V. Zaninovic, M. Song, D. Sandoval, S. Gukovsky and S. J. Pandol (1997). "Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis." *J Clin Invest* 100(7): 1853-62.
- Gukovskaya, A. S., I. Gukovsky, Y. Jung, M. Mouria and S. J. Pandol (2002a). "Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. Roles in cell injury processes of pancreatitis." *J Biol Chem* 277(25): 22595-604.
- Gukovskaya, A. S., E. Vaquero, V. Zaninovic, F. S. Gorelick, A. J. Lusic, M. L. Brennan, S. Holland and S. J. Pandol (2002b). "Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis." *Gastroenterology* 122(4): 974-84.

- Gukovsky, I., A. S. Gukovskaya, T. A. Blinman, V. Zaninovic and S. J. Pandol (1998). "Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis." *Am J Physiol* 275(6 Pt 1): G1402-14.
- Gupta, S., D. Campbell, B. Derijard and R. J. Davis (1995). "Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway." *Science* 267(5196): 389-93.
- Gupta, S., T. Barrett, A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H. K. Sluss, B. Derijard and R. J. Davis (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." *Embo J* 15(11): 2760-70.
- Gutteridge, J. M. C. (1993). *Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection*. The place of oxygen free radicals in HIV infections, Elsevier Science Ireland.
- Haber, F. and J. Weiss (1932). "Über die Katalyse des Hydroperoxydes." *Naturweiss.* 20: 948.
- Haberle, D., A. Wahllander and H. Sies (1979). "Assessment of the kidney function in maintenance of plasma glutathione concentration and redox state in anaesthetized rats." *FEBS Lett* 108(2): 335-40.
- Hagen, T. M., L. A. Brown and D. P. Jones (1986). "Protection against paraquat-induced injury by exogenous GSH in pulmonary alveolar type II cells." *Biochem Pharmacol* 35(24): 4537-42.
- Hahn, R., A. Wendel and L. Flohe (1978). "The fate of extracellular glutathione in the rat." *Biochim Biophys Acta* 539(3): 324-37.
- Halangk, W., M. M. Lerch, B. Brandt-Nedelev, W. Roth, M. Ruthenburger, T. Reinheckel, W. Domschke, H. Lippert, C. Peters and J. Deussing (2000). "Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis." *J Clin Invest* 106(6): 773-81.
- Halangk, W., B. Kruger, M. Ruthenburger, J. Sturzebecher, E. Albrecht, H. Lippert and M. M. Lerch (2002). "Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(2): G367-74.
- Hallenbeck, J. M. (2002). "The many faces of tumor necrosis factor in stroke." *Nat Med* 8(12): 1363-8.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1986). "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts." *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.
- Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease." *Am. J. Med.* 91(3C): 14S-22S.
- Halliwell, B. and O. I. Auroma (1991). "DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems." *FEBS Lett.* 281: 9-19.
- Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?" *Lancet* 344: 721-724.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems." *Free Radic Biol Med* 18(1): 125-6.
- Halliwell, B. (1996). "Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation." *Biochemical Society Transactions* 24(4): 1023-1027.
- Hammond, J. and J. Tesar (1980). "Pancreatitis-associated arthritis. Sequential study of synovial fluid abnormalities." *Jama* 244(7): 694-6.
- Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs and R. J. Ulevitch (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." *Science* 265(5173): 808-11.
- Hannigan, M., L. Zhan, Y. Ai and C. K. Huang (1998). "The role of p38 MAP kinase in TGF-beta1-induced signal transduction in human neutrophils." *Biochem Biophys Res Commun* 246(1): 55-8.

- Harris, C. M. and V. Massey (1997). "The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical." *J Biol Chem* 272(13): 8370-9.
- Hartwig, W., J. Werner, R. E. Jimenez, K. Z'Graggen, J. Weimann, K. B. Lewandrowski, A. L. Warshaw and C. Fernandez-del Castillo (1999). "Trypsin and activation of circulating trypsinogen contribute to pancreatitis-associated lung injury." *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): G1008-16.
- Hassan, H. M. (1989). "Microbial superoxide dismutases." *Adv Genet* 26: 65-97.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407(6805): 770-6.
- Hietaranta, A., E. Kemppainen, P. Puolakkainen, V. Sainio, R. Haapiainen, H. Peuravuori, E. Kivilaakso and T. Nevalainen (1999). "Extracellular phospholipases A2 in relation to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and systemic complications in severe acute pancreatitis." *Pancreas* 18(4): 385-91.
- Hietaranta, A. J., A. K. Saluja, L. Bhagat, V. P. Singh, A. M. Song and M. L. Steer (2001). "Relationship between NF-kappaB and trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation." *Biochem Biophys Res Commun* 280(1): 388-95.
- Higuchi, Y. (2004). "Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis." *J Cell Mol Med* 8(4): 455-64.
- Hille, R. and T. Nishino (1995). "Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase." *Faseb J* 9(11): 995-1003.
- Hille, R. (1996). "The Mononuclear Molybdenum Enzymes." *Chem Rev* 96(7): 2757-2816.
- Hirano, T., T. Manabe and T. Tobe (1992). "Cytoprotective effects of prostaglandins and a new potent protease inhibitor in acute pancreatitis." *Am J Med Sci* 304(3): 154-63.
- Hirota, M., F. Nozawa, A. Okabe, M. Shibata, T. Beppu, S. Shimada, H. Egami, Y. Yamaguchi, S. Ikei, T. Okajima, K. Okamoto and M. Ogawa (2000). "Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis." *Pancreas* 21(2): 141-6.
- Hofbauer, B., A. K. Saluja, M. M. Lerch, L. Bhagat, M. Bhatia, H. S. Lee, J. L. Frossard, G. Adler and M. L. Steer (1998). "Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats." *Am J Physiol* 275(2 Pt 1): G352-62.
- Hofken, T., N. Keller, F. Fleischer, B. Goke and A. C. Wagner (2000). "Map kinase phosphatases (MKP's) are early responsive genes during induction of cerulein hyperstimulation pancreatitis." *Biochem Biophys Res Commun* 276(2): 680-5.
- Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed and J. Tschopp (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." *Nat Immunol* 1(6): 489-95.
- Hollo, G., M. Tarjanyi, M. Varga and L. Flautner (1994). "Retinopathy of pancreatitis indicates multiple-organ failure and poor prognosis in severe acute pancreatitis." *Acta Ophthalmol (Copenh)* 72(1): 114-7.
- Holmgren, A. (1979). "Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 254(9): 3664-71.
- Holmgren, A. (1984). "Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin." *Methods Enzymol* 107: 295-300.
- Holmgren, A. (1990). Glutaredoxin: structure and function. *Glutathione: metabolism and physiological functions*. J. Viña. Florida, CRC, Boca Raton: 145-154.
- Hommes, D., B. van den Blink, T. Plasse, J. Bartelsman, C. Xu, B. Macpherson, G. Tytgat, M. Peppelenbosch and S. Van Deventer (2002). "Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease." *Gastroenterology* 122(1): 7-14.

- Hommel, D. W., M. P. Peppelenbosch and S. J. van Deventer (2003). "Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets." *Gut* 52(1): 144-51.
- Hong, J. H., K. C. Hur and J. M. Chung (2000). "Potentiation of early necrotic death of glucose-starved pheochromocytoma 12 cells by nerve growth factor." *Mol Cells* 10(4): 443-51.
- Horiuchi, S., M. Inoue and Y. Morino (1978). "Gamma-glutamyl transpeptidase: sidedness of its active site on renal brush-border membrane." *Eur J Biochem* 87(3): 429-37.
- Horowitz, J. H., E. B. Rypins, J. M. Henderson, S. B. Heymsfield, S. D. Moffitt, R. P. Bain, R. K. Chawla, J. C. Bleier and D. Rudman (1981). "Evidence for impairment of transsulfuration pathway in cirrhosis." *Gastroenterology* 81(4): 668-75.
- Houston, M., A. Estevez, P. Chumley, M. Aslan, S. Marklund, D. A. Parks and B. A. Freeman (1999). "Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling." *J Biol Chem* 274(8): 4985-94.
- Huang, C. S., M. E. Anderson and A. Meister (1993). "Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase." *J Biol Chem* 268(27): 20578-83.
- Huang, D. C. and A. Strasser (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." *Cell* 103(6): 839-42.
- Huang, Z. A., H. Yang, C. Chen, Z. Zeng and S. C. Lu (2000). "Inducers of gamma-glutamylcysteine synthetase and their effects on glutathione synthetase expression." *Biochim Biophys Acta* 1493(1-2): 48-55.
- Huang, Z. Z., C. Chen, Z. Zeng, H. Yang, J. Oh, L. Chen and S. C. Lu (2001). "Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration." *Faseb J* 15(1): 19-21.
- Hunter, T. (2000). "Signaling--2000 and beyond." *Cell* 100(1): 113-27.
- Hwang, C., A. J. Sinskey and H. F. Lodish (1992). "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum." *Science* 257(5076): 1496-502.
- Ikeda, A., P. M. Nishina and J. K. Naggert (2002). "The tubby-like proteins, a family with roles in neuronal development and function." *J Cell Sci* 115(Pt 1): 9-14.
- Ip, Y. T. and R. J. Davis (1998). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development." *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 205-19.
- Ishikawa, T. and H. Sies (1984). "Cardiac transport of glutathione disulfide and S-conjugate. Studies with isolated perfused rat heart during hydroperoxide metabolism." *J Biol Chem* 259(6): 3838-43.
- Ishikawa, T., K. Kobayashi, Y. Sogame and K. Hayashi (1989). "Evidence for leukotriene C4 transport mediated by an ATP-dependent glutathione S-conjugate carrier in rat heart and liver plasma membranes." *FEBS Lett* 259(1): 95-8.
- Jacobson, M. D., J. F. Burne and M. C. Raff (1994). "Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus." *Embo J* 13(8): 1899-910.
- Jewell, S. A., G. Bellomo, H. Thor, S. Orrenius and M. Smith (1982). "Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis." *Science* 217(4566): 1257-9.
- Jocelyn, P. C. (1973). *Biochemistry of the SH group*.
- Jocelyn, P. C. and A. Kamminga (1974). "The non-protein thiol of rat liver mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 343(2): 356-62.
- Johnson, C. D., A. N. Kingsnorth, C. W. Imrie, M. J. McMahon, J. P. Neoptolemos, C. McKay, S. K. Toh, P. Skaife, P. C. Leeder, P. Wilson, M. Larvin and L. D. Curtis (2001). "Double blind,

- randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis." *Gut* 48(1): 62-9.
- Justice, N. J. and Y. N. Jan (2002). "Variations on the Notch pathway in neural development." *Curr Opin Neurobiol* 12(1): 64-70.
- Kabakov, A. E. and V. L. Gabai (1994). "Heat-shock proteins maintain the viability of ATP-deprived cells: what is the mechanism?" *Trends Cell Biol* 4(6): 193-6.
- Kaiser, A. M., A. K. Saluja, A. Sengupta, M. Saluja and M. L. Steer (1995). "Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis." *Am J Physiol* 269(5 Pt 1): C1295-304.
- Kannan, R., J. F. Kuhlenkamp, M. Ookhtens and N. Kaplowitz (1992). "Transport of glutathione at blood-brain barrier of the rat: inhibition by glutathione analogs and age-dependence." *J Pharmacol Exp Ther* 263(3): 964-70.
- Kannan, R., J. R. Yi, D. Tang, B. V. Zlokovic and N. Kaplowitz (1996). "Identification of a novel, sodium-dependent, reduced glutathione transporter in the rat lens epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(11): 2269-75.
- Kannan, R., Y. Bao, Y. Wang, V. P. Sarthy and N. Kaplowitz (1999). "Protection from oxidant injury by sodium-dependent GSH uptake in retinal Muller cells." *Exp Eye Res* 68(5): 609-16.
- Kannan, R., R. Chakrabarti, D. Tang, K. J. Kim and N. Kaplowitz (2000). "GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Na⁺-dependent GSH transport in HCEC." *Brain Res* 852(2): 374-82.
- Kayyali, U. S., C. Donaldson, H. Huang, R. Abdelnour and P. M. Hassoun (2001). "Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia." *J Biol Chem* 276(17): 14359-65.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-57.
- Keshet, I., J. Lieman-Hurwitz and H. Cedar (1986). "DNA methylation affects the formation of active chromatin." *Cell* 44(4): 535-43.
- Ketterer, B. (1986). "Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases." *Xenobiotica*. 16: 957-973.
- Kilberg, M. S., H. N. Christensen and M. E. Handlogten (1979). "Cysteine as a system-specific substrate for transport system ASC in rat hepatocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 88(2): 744-51.
- Kim, J. S., L. He and J. J. Lemasters (2003). "Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis." *Biochem Biophys Res Commun* 304(3): 463-70.
- Kinnula, V. L., J. D. Crapo and K. Raivio (1995). "Biology of disease: Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung." *Lab. Invest.* 73(1): 3-19.
- Kloppel, G. and B. Maillet (1993). "Pathology of acute and chronic pancreatitis." *Pancreas* 8(6): 659-70.
- Koike, H., M. L. Steer and J. Meldolesi (1982). "Pancreatic effects of ethionine: blockade of exocytosis and appearance of crinophagy and autophagy precede cellular necrosis." *Am J Physiol* 242(4): G297-307.
- Koiwai, T., H. Oguchi, S. Kawa, Y. Yanagisawa, T. Kobayashi and T. Homma (1989). "The role of oxygen free radicals in experimental acute pancreatitis in the rat." *Int J Pancreatol* 5(2): 135-43.
- Kollef, M. H. and D. P. Schuster (1995). "The acute respiratory distress syndrome." *N Engl J Med* 332(1): 27-37.
- Kondo, T., G. L. Dale and E. Beutler (1981). "Studies on glutathione transport utilizing inside-out vesicles prepared from human erythrocytes." *Biochim Biophys Acta* 645(1): 132-6.

- Kosower, E. M. and N. S. Kosower (1969). "Lest I forget thee, glutathione." *Nature* 224(215): 117-20.
- Kosower, N. S. and E. M. Kosower (1978). "The glutathione status of the cells." *Int. Rev. Cytol.* 54: 109-160.
- Kosower, N. S. and E. M. Kosower (1983). Glutathione and cell membrane thiol status. *Functions of glutathione*. A. Larson, S. Orrenius, A. Holmgren and B. Mannervik. Nueva York, Editorial Raven.: 307-315.
- Kotenko, S. V., L. S. Izotova, O. V. Mirochnitchenko, E. Esterova, H. Dickensheets, R. P. Donnelly and S. Pestka (2001). "Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes." *J Biol Chem* 276(4): 2725-32.
- Kotlyarov, A., A. Neininger, C. Schubert, R. Eckert, C. Birchmeier, H. D. Volk and M. Gaestel (1999). "MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis." *Nat Cell Biol* 1(2): 94-7.
- Kruse, P., E. Hage and A. Lasson (1999). "Proteases and protease inhibitors in taurocholate-induced acute pancreatitis in rats." *Int J Pancreatol* 25(2): 113-21.
- Kruse, P., M. E. Anderson and S. Loft (2001). "Minor role of oxidative stress during intermediate phase of acute pancreatitis in rats." *Free Radic Biol Med* 30(3): 309-17.
- Kuby, J. (1994). Cytokines. *Immunology*. J. Kuby. New York, WH Freeman and Co: 297-322.
- Kusske, A. M., A. J. Rongione and H. A. Reber (1996). "Cytokines and acute pancreatitis." *Gastroenterology* 110(2): 639-42.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* 81(2): 807-69.
- Lampel, M. and H. F. Kern (1977). "Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue." *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 373(2): 97-117.
- Lankisch, P. G., C. Assmus, D. Lehnick, P. Maisonneuve and A. B. Lowenfels (2001). "Acute pancreatitis: does gender matter?" *Dig Dis Sci* 46(11): 2470-4.
- Lankisch, P. G., C. Assmus, P. Maisonneuve and A. B. Lowenfels (2002). "Epidemiology of pancreatic diseases in Luneburg County. A study in a defined German population." *Pancreatology* 2(5): 469-77.
- Larvin, M. and M. J. McMahon (1989). "APACHE-II score for assessment and monitoring of acute pancreatitis." *Lancet* 2(8656): 201-5.
- Lash, L. H. and D. P. Jones (1984). "Renal glutathione transport. Characteristics of the sodium-dependent system in the basal-lateral membrane." *J Biol Chem* 259(23): 14508-14.
- Lash, L. H., T. M. Hagen and D. P. Jones (1986). "Exogenous glutathione protects intestinal epithelial cells from oxidative injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(13): 4641-5.
- Lasson, A. and K. Ohlsson (1984). "Changes in the kallikrein kinin system during acute pancreatitis in man." *Thromb Res* 35(1): 27-41.
- Lerch, M. M., A. K. Saluja, M. Runzi, R. Dawra, M. Saluja and M. L. Steer (1993). "Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum." *Gastroenterology* 104(3): 853-61.
- Lerch, M. M. and G. Adler (1994). "Experimental animal models of acute pancreatitis." *Int J Pancreatol* 15(3): 159-70.
- Lewis, T. S., P. S. Shapiro and N. G. Ahn (1998). "Signal transduction through MAP kinase cascades." *Adv Cancer Res* 74: 49-139.

- Lin, E., S. E. Calvano and S. F. Lowry (2000). "Inflammatory cytokines and cell response in surgery." *Surgery* 127(2): 117-26.
- Linnane, A. W., S. Marzuki, T. Ozawa and M. Tanaka (1989). "Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases." *Lancet* 1(8639): 642-5.
- Liras, G. and F. Carballo (1996). "An impaired phagocytic function is associated with leucocyte activation in the early stages of severe acute pancreatitis." *Gut* 39(1): 39-42.
- Liu, H. S., C. E. Pan, Q. G. Liu, W. Yang and X. M. Liu (2003). "Effect of NF-kappaB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis." *World J Gastroenterol* 9(11): 2513-8.
- Liu, R. M., L. Gao, J. Choi and H. J. Forman (1998). "gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal." *Am J Physiol* 275(5 Pt 1): L861-9.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* 86(1): 147-57.
- Ljubic, D., T. Piplovic-Vukovic, V. Raos and P. Andrews (1996). "Acute renal failure as a complication of acute pancreatitis." *Ren Fail* 18(4): 629-33.
- Lluis, J. M., A. Colell, C. Garcia-Ruiz, N. Kaplowitz and J. C. Fernandez-Checa (2003). "Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress." *Gastroenterology* 124(3): 708-24.
- Lombardi, B., L. W. Estes and D. S. Longnecker (1975). "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.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lu, S. C., C. Garcia-Ruiz, J. Kuhlenkamp, M. Ookhtens, M. Salas-Prato and N. Kaplowitz (1990). "Hormonal regulation of glutathione efflux." *J Biol Chem* 265(27): 16088-95.
- Lu, S. C., J. Kuhlenkamp, C. Garcia-Ruiz and N. Kaplowitz (1991). "Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat." *J Clin Invest* 88(1): 260-9.
- Lu, S. C., J. L. Ge, J. Kuhlenkamp and N. Kaplowitz (1992). "Insulin and glucocorticoid dependence of hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in the rat. Studies in cultured hepatocytes and in vivo." *J Clin Invest* 90(2): 524-32.
- Lu, S. C., J. Kuhlenkamp, J. L. Ge, W. M. Sun and N. Kaplowitz (1994). "Specificity and directionality of thiol effects on sinusoidal glutathione transport in rat liver." *Mol Pharmacol* 46(3): 578-85.
- Lu, S. C. (1999). "Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies." *Faseb J* 13(10): 1169-83.
- Lundberg, A. H., N. Granger, J. Russell, S. Callicutt, L. W. Gaber, M. Kotb, O. Sabek and A. O. Gaber (2000). "Temporal correlation of tumor necrosis factor-alpha release, upregulation of pulmonary ICAM-1 and VCAM-1, neutrophil sequestration, and lung injury in diet-induced pancreatitis." *J Gastrointest Surg* 4(3): 248-57.
- Luthen, R., C. Niederau and J. H. Grendell (1995a). "Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats." *Am J Physiol* 268(4 Pt 1): G592-604.
- Luthen, R., C. Niederau, M. Niederau, L. D. Ferrell and J. H. Grendell (1995b). "Influence of ductal pressure and infusates on activity and subcellular distribution of lysosomal enzymes in the rat pancreas." *Gastroenterology* 109(2): 573-81.

- Luthen, R., J. H. Grendell, C. Niederau and D. Haussinger (1998). "Trypsinogen activation and glutathione content are linked to pancreatic injury in models of biliary acute pancreatitis." *Int J Pancreatol* 24(3): 193-202.
- Luthen, R. E., B. A. Neuschwander-Tetri, C. Niederau, L. D. Ferrell and J. H. Grendell (1994). "The effect of L-buthionine-[S,R]-sulfoximine on the pancreas in mice. A model of weakening glutathione-based defense mechanisms." *Int J Pancreatol* 16(1): 31-6.
- Malka, D., S. Vasseur, H. Bodeker, E. M. Ortiz, N. J. Dusetti, P. Verrando, J. C. Dagorn and J. L. Iovanna (2000). "Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein I activation." *Gastroenterology* 119(3): 816-28.
- Marklund, S. L., E. Holme and L. Hellner (1982). "Superoxide dismutase in extracellular fluids." *Clin Chim Acta* 126(1): 41-51.
- Martensson, J., A. Jain and A. Meister (1990). "Glutathione is required for intestinal function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5): 1715-9.
- Martin, L. J. (2001). "Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review)." *Int J Mol Med* 7(5): 455-78.
- Marton, J., G. Farkas, T. Takacs, Z. Nagy, Z. Szasz, J. Varga, K. Jarmay, A. Balogh and J. Lonovics (1998). "Beneficial effects of pentoxifylline treatment of experimental acute pancreatitis in rats." *Res Exp Med (Berl)* 197(5): 293-9.
- Masamune, A., M. Satoh, K. Kikuta, Y. Sakai, A. Satoh and T. Shimosegawa (2003). "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase blocks activation of rat pancreatic stellate cells." *J Pharmacol Exp Ther* 304(1): 8-14.
- Massague, J. (2000). "How cells read TGF-beta signals." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3): 169-78.
- Massey, V., H. Komai, G. Palmer and G. B. Elion (1970). "On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines." *J Biol Chem* 245(11): 2837-44.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase . An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein." *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049-6055.
- McCord, J. M., B. B. Keele and Y. Fridovich (1974). "An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 35-97.
- McCutcheon, A. and D. Race (1962). "Experimental pancreatitis: a possible etiology of post-operative pancreatitis." *Ann Surg* 155: 523-531.
- McKay, C. J., G. Gallagher, B. Brooks, C. W. Imrie and J. N. Baxter (1996). "Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis." *Br J Surg* 83(7): 919-23.
- McKelvey, T. G., M. E. Hollwarth, D. N. Granger, T. D. Engerson, U. Landler and H. P. Jones (1988). "Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney." *Am J Physiol* 254(5 Pt 1): G753-60.
- Medan, D., L. Wang, X. Yang, S. Dokka, V. Castranova and Y. Rojanasakul (2002). "Induction of neutrophil apoptosis and secondary necrosis during endotoxin-induced pulmonary inflammation in mice." *J Cell Physiol* 191(3): 320-6.
- Meister, A. (1973). "On the enzymology of amino acid transport." *Science* 180(81): 33-9.
- Meister, A. and M. E. Anderson (1983). "Glutathione." *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.
- Meister, A. (1988). "On the discovery of glutathione." *Trends Biochem Sci* 13(5): 185-8.
- Meister, A. (1991). "Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy." *Pharmacol Ther* 51(2): 155-94.

- Meister, A. (1994). "Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals." *J Biol Chem* 269(13): 9397-400.
- Minden, A., A. Lin, F. X. Claret, A. Abo and M. Karin (1995). "Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs." *Cell* 81(7): 1147-57.
- Minutoli, L., D. Altavilla, H. Marini, M. Passaniti, A. Bitto, P. Seminara, F. S. Venuti, C. Famulari, A. Macri, A. Versaci and F. Squadrito (2004). "Protective effects of SP600125 a new inhibitor of c-jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK1/2) in an experimental model of cerulein-induced pancreatitis." *Life Sci* 75(24): 2853-66.
- Miquel, J., A. C. Economos, J. Fleming and J. E. Johnson, Jr. (1980). "Mitochondrial role in cell aging." *Exp Gerontol* 15(6): 575-91.
- Mizunuma, T., S. Kawamura and Y. Kishino (1984). "Effects of injecting excess arginine on rat pancreas." *J Nutr* 114(3): 467-71.
- Morita, K., K. Ishimura, Y. Tsuruo and D. L. Wong (1999). "Dexamethasone enhances serum deprivation-induced necrotic death of rat C6 glioma cells through activation of glucocorticoid receptors." *Brain Res* 816(2): 309-16.
- Murrell, G. A. and W. G. Rapeport (1986). "Clinical pharmacokinetics of allopurinol." *Clin Pharmacokinet* 11(5): 343-53.
- Nakae, Y., S. Naruse, M. Kitagawa, S. Hirao, R. Yamamoto and T. Hayakawa (1995). "Activation of trypsinogen in experimental models of acute pancreatitis in rats." *Pancreas* 10(3): 306-13.
- Navarro, S. (1991). Incidencia y etiología de la pancreatitis aguda. *Pancreatitis*. Navarro. S. Barcelona, Ed. Doyma SA: 5-10.
- Navarro, S., M. Pérez-Mateo and L. Guarner (2002). *Tratado de páncreas exocrino*. Barcelona, J&C Ediciones Médicas S.L.
- N.E.A.U.E. (1999). "Decisión del Consejo de 23 de Marzo de 1998 relativa a la celebración por la Comunidad del Convenio Europeo sobre la protección de animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos." *DOCE L*.
- Neoptolemos, J. P., M. Raraty, M. Finch and R. Sutton (1998). "Acute pancreatitis: the substantial human and financial costs." *Gut* 42(6): 886-91.
- Neuschwander-Tetri, B. A., L. D. Ferrell, R. J. Sukhabote and J. H. Grendell (1992). "Glutathione monoethyl ester ameliorates cerulein-induced pancreatitis in the mouse." *J Clin Invest* 89(1): 109-16.
- Neuschwander-Tetri, B. A., M. Barnidge and C. G. Janney (1994). "Cerulein-induced pancreatic cysteine depletion: prevention does not diminish acute pancreatitis in the mouse." *Gastroenterology* 107(3): 824-30.
- Nevalainen, T. J. and H. J. Aho (1992). "Standards of morphological evaluation and histological grading in experimental acute pancreatitis." *Eur Surg Res* 24 Suppl 1: 14-23.
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (2003). "Apoptosis. Life and death decisions." *Science* 299(5604): 214-5.
- Nick, J. A., N. J. Avdi, S. K. Young, L. A. Lehman, P. P. McDonald, S. C. Frasch, M. A. Billstrom, P. M. Henson, G. L. Johnson and G. S. Worthen (1999). "Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils." *J Clin Invest* 103(6): 851-8.
- Niederau, C., L. D. Ferrell and J. H. Grendell (1985). "Cerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin." *Gastroenterology* 88(5 Pt 1): 1192-204.

- Niederau, M., C. Niederau, G. Strohmeyer and J. H. Grendell (1989). "Comparative effects of CCK receptor antagonists on rat pancreatic secretion in vivo." *Am J Physiol* 256(1 Pt 1): G150-7.
- Nishitai, G., N. Shimizu, T. Negishi, H. Kishimoto, K. Nakagawa, D. Kitagawa, T. Watanabe, H. Momose, S. Ohata, S. Tanemura, S. Asaka, J. Kubota, R. Saito, H. Yoshida, T. W. Mak, T. Wada, J. M. Penninger, N. Azuma, H. Nishina and T. Katada (2004). "Stress induces mitochondria-mediated apoptosis independent of SAPK/JNK activation in embryonic stem cells." *J Biol Chem* 279(3): 1621-6.
- Noh, K. M., J. C. Lee, Y. H. Ahn, S. H. Hong and J. Y. Koh (1999). "Insulin-induced oxidative neuronal injury in cortical culture: mediation by induced N-methyl-D-aspartate receptors." *IUBMB Life* 48(3): 263-9.
- Nonaka, A., T. Manabe, K. Tamura, N. Asano, K. Imanishi and T. Tobe (1989). "Changes of xanthine oxidase, lipid peroxide and superoxide dismutase in mouse acute pancreatitis." *Digestion* 43(1-2): 41-6.
- Nonaka, A., T. Manabe and T. Tobe (1991). "Effect of a new synthetic ascorbic acid derivative as a free radical scavenger on the development of acute pancreatitis in mice." *Gut* 32(5): 528-32.
- Norman, J. (1998). "The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis." *Am J Surg* 175(1): 76-83.
- Norman, J. G., G. W. Fink and M. G. Franz (1995a). "Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression." *Arch Surg* 130(9): 966-70.
- Norman, J. G., M. G. Franz, G. S. Fink, J. Messina, P. J. Fabri, W. R. Gower and L. C. Carey (1995b). "Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine blockade." *Ann Surg* 221(6): 625-31; discussion 631-4.
- Norman, J. G., G. W. Fink, W. Denham, J. Yang, G. Carter, C. Sexton, J. Falkner, W. R. Gower and M. G. Franz (1997). "Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction." *Dig Dis Sci* 42(8): 1783-8.
- Norton, I. D. and J. E. Clain (2001). "Optimising outcomes in acute pancreatitis." *Drugs* 61(11): 1581-91.
- Ochoa, S. (1983). "Regulation of protein synthesis initiation in eukaryotes." *Arch. Biochem. Biophys.* 223: 325-349.
- Ohlsson, K. and S. Genell (1991). Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatic disease. Progress and prospects.* J. C. I. CW. Londres, Springer-Verlag: 213-225.
- Okusawa, S., J. A. Gelfand, T. Ikejima, R. J. Connolly and C. A. Dinarello (1988). "Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition." *J Clin Invest* 81(4): 1162-72.
- Old, L. J. (1988). "Tumor necrosis factor." *Sci Am* 258(5): 59-60, 69-75.
- Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." *Cell Signal* 12(1): 1-13.
- Ookhtens, M. and N. Kaplowitz (1998). "Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine." *Semin Liver Dis* 18(4): 313-29.
- Opie, E. (1901). "The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis." *Bull Johns Hopkins Hosp* 12: 182-192.
- Oppenheimer, L., V. P. Wellner, O. W. Griffith and A. Meister (1979). "Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites." *J Biol Chem* 254(12): 5184-90.
- Orrenius, S. and P. Moldeus (1984). "The multiple roles of glutathione in drug metabolism." *Trends. Pharmacol. Sci.* 5: 432-435.

- Osman, M. O. and S. L. Jensen (1999). "Acute pancreatitis: the pathophysiological role of cytokines and integrins. New trends for treatment?" *Dig Surg* 16(5): 347-62.
- Otani, T., S. M. Chepilko, J. H. Grendell and F. S. Gorelick (1998). "Codistribution of TAP and the granule membrane protein GRAMP-92 in rat caerulein-induced pancreatitis." *Am J Physiol* 275(5 Pt 1): G999-G1009.
- Otani, T., A. Matsukura and Y. Seyama (2003). "Serine protease inhibitors cause F-actin redistribution in pancreatic acini?" *Gastroenterology* 124(2): 583-4.
- Packer, L., E. H. Witt and H. J. Tritschler (1995). "alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant." *Free Radic Biol Med* 19(2): 227-50.
- Pajares, M. A., F. Corrales, C. Durán, J. M. Mato and L. Alvarez (1992a). "How is rat liver S-adenosylmethionine synthetase regulated?" *FEBS Letters*. 309(1): 1-4.
- Pajares, M. A., C. Durán, F. Corrales, M. M. Pliego and J. M. Mato (1992b). "Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione." *J. Biol. Chem.* 267(25): 17598-17605.
- Pallardo, F. V., J. Sastre, M. Asensi, F. Rodrigo, J. M. Estrela and J. Vina (1991). "Physiological changes in glutathione metabolism in foetal and newborn rat liver." *Biochem J* 274 (Pt 3): 891-3.
- Papadakis, K. A. and S. R. Targan (2000). "Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Annu Rev Med* 51: 289-98.
- Park, J. M., F. R. Greten, Z. W. Li and M. Karin (2002). "Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition." *Science* 297(5589): 2048-51.
- Parks, D. A., T. K. Williams and J. S. Beckman (1988). "Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation." *Am J Physiol* 254(5 Pt 1): G768-74.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* 22(2): 153-83.
- Peppelenbosch, M., E. Boone, G. E. Jones, S. J. van Deventer, G. Haegeman, W. Fiers, J. Grooten and A. J. Ridley (1999). "Multiple signal transduction pathways regulate TNF-induced actin reorganization in macrophages: inhibition of Cdc42-mediated filopodium formation by TNF." *J Immunol* 162(2): 837-45.
- Pereda, J., L. Sabater, N. Cassinello, L. Gomez-Cambronero, D. Closa, E. Folch-Puy, L. Aparisi, J. Calvete, M. Cerda, S. Lledo, J. Vina and J. Sastre (2004). "Effect of simultaneous inhibition of TNF-alpha production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases." *Ann Surg* 240(1): 108-16.
- Perkins, N. D. (2000). "The Rel/NF-kappa B family: friend and foe." *Trends Biochem Sci* 25(9): 434-40.
- Pezzilli, R., P. Billi, R. Miniero and B. Barakat (1997). "Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis." *Dig Dis Sci* 42(7): 1469-72.
- Pezzilli, R., P. Billi and A. M. Morselli-Labate (1998). "Severity of acute pancreatitis: relationship with etiology, sex and age." *Hepatogastroenterology* 45(23): 1859-64.
- Pfeffer, K. D., T. P. Huecksteadt and J. R. Hoidal (1994). "Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells. Cytokine and steroid regulation." *J Immunol* 153(4): 1789-97.
- Philpot, R. M. (1991). "Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues." *Methods. Enzymol.* 206: 623-631.
- Pietersma, A., B. C. Tilly, M. Gaestel, N. de Jong, J. C. Lee, J. F. Koster and W. Sluiter (1997). "p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level." *Biochem Biophys Res Commun* 230(1): 44-8.

- Poch, B., F. Gansauge, B. Rau, U. Wittel, S. Gansauge, A. K. Nussler, M. Schoenberg and H. G. Beger (1999). "The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation." *FEBS Lett* 461(3): 268-72.
- Polster, B. M., K. W. Kinnally and G. Fiskum (2001). "BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability." *J Biol Chem* 276(41): 37887-94.
- Porras, A., S. Zuluaga, E. Black, A. Valladares, A. M. Alvarez, C. Ambrosino, M. Benito and A. R. Nebreda (2004). "P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli." *Mol Biol Cell* 15(2): 922-33.
- Prescott, L. F., J. Park, A. Ballantyne, P. Adrianssens and A. T. Proudfoot (1977). "Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine." *Lancet* 2 (8035): 432-434.
- Proskuryakov, S. Y., A. G. Konoplyannikov and V. L. Gabai (2003). "Necrosis: a specific form of programmed cell death?" *Exp Cell Res* 283(1): 1-16.
- Pryor, W. A., G. L. Squadrito and M. Friedman (1995). "A new mechanism for the toxicity of ozone." *Toxicol Lett* 82-83: 287-93.
- Pyke, S., H. Lew and A. Quintanilha (1986). "Severe depletion in liver glutathione during physical exercise." *Biochem Biophys Res Commun* 139(3): 926-31.
- Radi, R., S. Tan, E. Prodanov, R. A. Evans and D. A. Parks (1992). "Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production." *Biochim Biophys Acta* 1122(2): 178-82.
- Radi, R., H. Rubbo, K. Bush and B. A. Freeman (1997). "Xanthine oxidase binding to glycosaminoglycans: kinetics and superoxide dismutase interactions of immobilized xanthine oxidase-heparin complexes." *Arch Biochem Biophys* 339(1): 125-35.
- Rahman, S. H., K. Ibrahim, M. Larvin, A. Kingsnorth and M. J. McMahon (2004). "Association of antioxidant enzyme gene polymorphisms and glutathione status with severe acute pancreatitis." *Gastroenterology* 126(5): 1312-22.
- Ranson, J. H., D. F. Roses and S. D. Fink (1973). "Early respiratory insufficiency in acute pancreatitis." *Ann Surg* 178(1): 75-9.
- Ranson, J. H., K. M. Rifkind, D. F. Roses, S. D. Fink, K. Eng and F. C. Spencer (1974). "Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis." *Surg Gynecol Obstet* 139(1): 69-81.
- Rau, B., B. Poch, F. Gansauge, A. Bauer, A. K. Nussler, T. Nevalainen, M. H. Schoenberg and H. G. Beger (2000). "Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage?" *Ann Surg* 231(3): 352-60.
- Rawley, D. A. and B. Halliwell (1983). "Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent mechanism: Relevance to the pathology of rheumatoid disease." *Clin. Sci.* 64: 649-653.
- Read, M. A., M. Z. Whitley, S. Gupta, J. W. Pierce, J. Best, R. J. Davis and T. Collins (1997). "Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways." *J Biol Chem* 272(5): 2753-61.
- Reinheckel, T., B. Nedeliev, J. Prause, W. Augustin, H. U. Schulz, H. Lippert and W. Halangk (1998). "Occurrence of oxidatively modified proteins: an early event in experimental acute pancreatitis." *Free Radic Biol Med* 24(3): 393-400.
- Ren, H. B., Z. S. Li, G. M. Xu, Z. X. Tu, X. G. Shi, Y. T. Jia and Y. F. Gong (2004). "Dynamic changes of mitogen-activated protein kinase signal transduction in rats with severe acute pancreatitis." *Chin J Dig Dis* 5(3): 123-5.

- Richman, P. and A. Meister (1975). "Regulation of g-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feed back inhibition by glutathione." *J. Biol. Chem.* 250: 1422-1426.
- Rinderknecht, H. (1988). "Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation?" *Int J Pancreatol* 3(2-3): 105-12.
- Robertson, C. S., G. S. Basran and J. G. Hardy (1988). "Lung vascular permeability in patients with acute pancreatitis." *Pancreas* 3(2): 162-5.
- Rock, C. L., R. A. Jacob and P. E. Bowen (1996). "Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids." *J Am Diet Assoc* 96(7): 693-702; quiz 703-4.
- Rodriguez, A. M., P. M. Carrico, J. E. Mazurkiewicz and J. A. Melendez (2000). "Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H(2)O(2)." *Free Radic Biol Med* 29(9): 801-13.
- Rouault, T. A. and R. D. Klausner (1996). "The impact of oxidative stress on eukaryotic iron metabolism." *EXS.* 77: 183-197.
- Rouquette, M., S. Page, R. Bryant, M. Benboubetra, C. R. Stevens, D. R. Blake, W. D. Whish, R. Harrison and D. Tosh (1998). "Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture." *FEBS Lett* 426(3): 397-401.
- Saldeen, J. (2000). "Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells." *Endocrinology* 141(6): 2003-10.
- Salomone, T., P. Tosi, N. Di Battista, N. Binetti, C. Raiti, P. Tomassetti, M. Migliori and L. Gullo (2002). "Impaired alveolar gas exchange in acute pancreatitis." *Dig Dis Sci* 47(9): 2025-8.
- Saluja, A., M. Saluja, A. Villa, U. Leli, P. Rutledge, J. Meldolesi and M. Steer (1989). "Pancreatic duct obstruction in rabbits causes digestive zymogen and lysosomal enzyme colocalization." *J Clin Invest* 84(4): 1260-6.
- Saluja, A. K. and M. L. P. Steer (1999). "Pathophysiology of pancreatitis. Role of cytokines and other mediators of inflammation." *Digestion* 60 Suppl 1: 27-33.
- Sanders, S. A., R. Eisenthal and R. Harrison (1997). "NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion." *Eur J Biochem* 245(3): 541-8.
- Sandoval, D., A. Gukovskaya, P. Reavey, S. Gukovsky, A. Sisk, P. Braquet, S. J. Pandol and S. Poucell-Hatton (1996). "The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis." *Gastroenterology* 111(4): 1081-91.
- Sandoval, J., J. L. Rodriguez, G. Tur, G. Serviddio, J. Pereda, A. Boukaba, J. Sastre, L. Torres, L. Franco and G. Lopez-Rodas (2004). "RNAPol-ChIP: a novel application of chromatin immunoprecipitation to the analysis of real-time gene transcription." *Nucleic Acids Res* 32(11): e88.
- Sanfey, H., G. B. Bulkley and J. L. Cameron (1984). "The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis." *Ann Surg* 200(4): 405-13.
- Sanfey, H., G. B. Bulkley and J. L. Cameron (1985). "The pathogenesis of acute pancreatitis. The source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models." *Ann Surg* 201(5): 633-9.
- Sans, M. D., Q. Xie and J. A. Williams (2004). "Regulation of translation elongation and phosphorylation of eEF2 in rat pancreatic acini." *Biochem Biophys Res Commun* 319(1): 144-51.
- Sastre, J., N. Asensi, E. Gascó, F. V. Pallardó, J. A. Ferrero, T. Furukawa and J. Viña (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: Prevention by antioxidant administration." *Am. J. Physiol.* 32: R992-R995.

- Sastre, J., M. Asensi, F. Rodrigo, F. V. Pallardo, M. Vento and J. Vina (1994). "Antioxidant administration to the mother prevents oxidative stress associated with birth in the neonatal rat." *Life Sci* 54(26): 2055-9.
- Sastre, J., F. V. Pallardo, R. Pla, A. Pellin, G. Juan, J. E. O'Connor, J. M. Estrela, J. Miquel and J. Vina (1996). "Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes." *Hepatology* 24(5): 1199-205.
- Satoh, E., M. Okada, T. Takadera and T. Ohyashiki (2005). "Glutathione depletion promotes aluminum-mediated cell death of PC12 cells." *Biol Pharm Bull* 28(6): 941-6.
- Sawyer, D. T. (1988). The redox thermodynamics for dioxygen species (O_2 , $O_2^{\cdot-}$, HOO^{\cdot} , H_2O_2 and HOO^-) and monooxygen species (O , O^- , $\cdot OH$, and OH^-) in water and aprotic solvents. *Oxygen radicals in biology and medicine*. M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag. New York, Ed. Plenum Press.: 11-20.
- Schafer, C., S. E. Ross, M. J. Bragado, G. E. Groblewski, S. A. Ernst and J. A. Williams (1998). "A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini." *J Biol Chem* 273(37): 24173-80.
- Schardinger, F. (1902). *Z. Untersuch Genussmittel* 5: 1113-1121.
- Scheele, G. and R. Jacoby (1982). "Conformational changes associated with proteolytic processing of presecretory proteins allow glutathione-catalyzed formation of native disulfide bonds." *J Biol Chem* 257(20): 12277-82.
- Schild, L., R. Matthias, A. Stanarius, G. Wolf, W. Augustin and W. Halangk (1999). "Induction of permeability transition in pancreatic mitochondria by cerulein in rats." *Mol Cell Biochem* 195(1-2): 191-7.
- Schönenberg, M. H., M. Büchler, M. Gaspar, A. Stinner, M. Younes, I. Melzner, B. Bültmann and H. G. Beger (1990). "Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat." *Gut* 31(10): 1138-43.
- Schönenberg, M. H., M. Buchler, K. Baczako, B. Bultmann, M. Younes, M. Gaspar, R. Kirchmayr and H. G. Beger (1991). "The involvement of oxygen radicals in acute pancreatitis." *Klin Wochenschr* 69(21-23): 1025-31.
- Schönenberg, M. H., M. Büchler and H. G. Beger (1992). "The role of oxygen radicals in experimental acute pancreatitis." *Free Radic Biol Med* 12(6): 515-22.
- Schölmerich, J., A. Heinisch and H. G. Leser (1993). "Diagnostic approach to acute pancreatitis: diagnosis, assessment of etiology and prognosis." *Hepatogastroenterology* 40(6): 531-7.
- Schramek, H. (2002). "MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease." *News Physiol Sci* 17: 62-7.
- Schuchard, M. D., R. J. Mehigh, S. L. Cockrill, G. T. Lipscomb, J. D. Stephan, J. Wildsmith, R. Valdes-Camin, W. K. Kappel, A. J. Rai and G. B. Scott (2005). "Artificial isoform profile modification following treatment of human plasma or serum with protease inhibitor, monitored by 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry." *Biotechniques* 39(2): 239-47.
- Schulz, H. U. and C. Niederau (1994). "Oxidative stress-induced changes in pancreatic acinar cells: insights from in vitro studies." *Hepatogastroenterology* 41(4): 309-12.
- Schulz, H. U., C. Niederau, H. Klonowski-Stumpe, W. Halangk, R. Luthen and H. Lippert (1999). "Oxidative stress in acute pancreatitis." *Hepatogastroenterology* 46(29): 2736-50.
- Schulze-Lohoff, E., C. Hugo, S. Rost, S. Arnold, A. Gruber, B. Brune and R. B. Sterzel (1998). "Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors." *Am J Physiol* 275(6 Pt 2): F962-71.
- Scoggins, C. R., I. M. Meszoely, M. Wada, A. L. Means, L. Yang and S. D. Leach (2000). "p53-dependent acinar cell apoptosis triggers epithelial proliferation in duct-ligated murine pancreas." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(4): G827-36.

- Seelig, G. F., R. P. Simonsen and A. Meister (1984). "Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits." *J Biol Chem* 259(15): 9345-7.
- Seitz, M., P. Loetscher, B. Dewald, H. Towbin, H. Gallati and M. Baggiolini (1995). "Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts." *Eur J Immunol* 25(4): 1129-32.
- Serviddio, G., J. Pereda, F. V. Pallardo, J. Carretero, C. Borrás, J. Cutrin, G. Vendemiale, G. Poli, J. Vina and J. Sastre (2004). "Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress." *Hepatology* 39(3): 711-20.
- Sevillano, S., A. M. de la Mano, M. A. Manso, A. Orfao and I. De Dios (2003). "N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis." *Biochim Biophys Acta* 1639(3): 177-84.
- Sharer, N., P. Scott, D. Deardon, S. Lee, P. Taylor and J. Braganza (1995). "Clinical trial of 24 hours treatment with glutathione precursors in acute pancreatitis." *Clin Drug Invest* 10: 147-157.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A. Grollman (1992). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." *Nature* 349: 431-434.
- Sies, H. and T. P. Akerboom (1984). "Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues." *Methods Enzymol* 105: 445-51.
- Sies, H. (1986). "Biochemistry of oxidative stress." *Angewandte Chem.* 25: 1058-1071.
- Sies, H. (1993). "Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection." *Mutation Research* 299(3/4): 183.
- Simeone, D. M., L. Zhang, K. Graziano, B. Nicke, T. Pham, C. Schaefer and C. D. Logsdon (2001). "Smad4 mediates activation of mitogen-activated protein kinases by TGF-beta in pancreatic acinar cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 281(1): C311-9.
- Singh, V. P., A. K. Saluja, L. Bhagat, A. J. Hietaranta, A. Song, A. Mykoniatis, G. J. Van Acker and M. L. Steer (2001). "Serine protease inhibitor causes F-actin redistribution and inhibition of calcium-mediated secretion in pancreatic acini." *Gastroenterology* 120(7): 1818-27.
- Slater, T. F. (1984). "Free radical mechanism in tissue injury." *Biochem. J.* 222: 1-15.
- Smith, K. G., A. Strasser and D. L. Vaux (1996). "Crma expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease." *Embo J* 15(19): 5167-76.
- Sperandio, S., I. de Belle and D. E. Bredesen (2000). "An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14376-81.
- Srivastava, S. K. and E. Beutler (1969). "The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes." *J Biol Chem* 244(1): 9-16.
- Stadtman, E. R., P. E. Starke-Reed, C. N. Oliver, J. M. Carney and R. A. Floyd (1992). Protein modification in aging. I. Emerit and B. Chance. Basel, Virkhäuser Verlag. (Suiza). 64-72.
- Steer, M. (2002). "Pancreatitis severity: who calls the shots?" *Gastroenterology* 122(4): 1168-72.
- Steer, M. L. (2001). "Relationship between pancreatitis and lung diseases." *Respir Physiol* 128(1): 13-6.
- Stenson, W. F., E. Lobos and H. J. Wedner (1983). "Glutathione depletion inhibits amylase release in guinea pig pancreatic acini." *Am J Physiol* 244(3): G273-7.
- Stirpe, F. and E. Della Corte (1969). "The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O)." *J Biol Chem* 244(14): 3855-63.

- Sun, H., C. H. Charles, L. F. Lau and N. K. Tonks (1993). "MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo." *Cell* 75(3): 487-93.
- Sun, W. M., Z. Z. Huang and S. C. Lu (1996). "Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation." *Biochem J* 320 (Pt 1): 321-8.
- Sweiry, J. H. and G. E. Mann (1996). "Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis." *Scand J Gastroenterol Suppl* 219: 10-5.
- Tamura, K., T. Manabe, K. Imanishi, H. Nishikawa, G. Ohshio and T. Tobe (1992). "Toxic effects of oxygen-derived free radicals on rat pancreatic acini; an in vitro study." *Hepatogastroenterology* 39(6): 536-9.
- Tan, S., Y. Yokoyama, E. Dickens, T. G. Cash, B. A. Freeman and D. A. Parks (1993). "Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock." *Free Radic Biol Med* 15(4): 407-14.
- Tartaglia, L. A. and D. V. Goeddel (1992). "Two TNF receptors." *Immunol Today* 13(5): 151-3.
- Tateishi, N., T. Higashi, S. Shinya, A. Naruse and Y. Sakamoto (1974a). "Studies on the regulation of glutathione level in rat liver." *J Biochem (Tokyo)* 75(1): 93-103.
- Tateishi, N., T. Higashi, S. Shinya, A. Naruse and Y. Sakamoto (1974b). "Studies of the regulation of glutathione level in rat liver." *J. Biochem.* 75: 90-103.
- Tateishi, N., H. Shiozaki, K. Nakashima, A. Naruse and T. Higashi (1977). "Rat liver glutathione: Possible role as reservoir of cysteine." *J. Nutr.* 107: 51-58.
- Tateishi, N. and Y. Sakamoto (1983). Nutritional significance of glutathione in rat liver. *Glutathione storage, transport and turnover in mammals*. Y. Sakamoto. Tokyo, Scientific Soxoeu Press: 13-38.
- Telek, G., J. Y. Scoazec, J. Chariot, R. Ducroc, G. Feldmann and C. Roz (1999). "Cerium-based histochemical demonstration of oxidative stress in taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. A confocal laser scanning microscopic study." *J Histochem Cytochem* 47(9): 1201-12.
- Telek, G., J. Regoly-Merei, G. C. Kovacs, L. Simon, Z. Nagy, J. Hamar and F. Jakab (2001). "The first histological demonstration of pancreatic oxidative stress in human acute pancreatitis." *Hepatogastroenterology* 48(41): 1252-8.
- Terada, L. S., J. J. Dormish, P. F. Shanley, J. A. Leff, B. O. Anderson and J. E. Repine (1992). "Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion." *Am J Physiol* 263(3 Pt 1): L394-401.
- Terrádez, P., M. Asensi, M. C. Lasso de la Vega, I. R. Puertes, J. Viña and J. M. Estrela (1993). "Depletion of tumor glutathione in vivo by buthionine sulphoximine: Modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth." *Biochem. J.* 292: 477-483.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* 281(5381): 1312-6.
- Todd, J. L., K. G. Tanner and J. M. Denu (1999). "Extracellular regulated kinases (ERK) 1 and ERK2 are authentic substrates for the dual-specificity protein-tyrosine phosphatase VHR. A novel role in down-regulating the ERK pathway." *J Biol Chem* 274(19): 13271-80.
- Tolbert, N. E. and E. Essner (1981). "Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes." *J Cell Biol* 91(3 Pt 2): 271s-283s.
- Tournier, C., P. Hess, D. D. Yang, J. Xu, T. K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S. N. Jones, R. A. Flavell and R. J. Davis (2000). "Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway." *Science* 288(5467): 870-4.
- Tournier, C., C. Dong, T. K. Turner, S. N. Jones, R. A. Flavell and R. J. Davis (2001). "MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines." *Genes Dev* 15(11): 1419-26.

- Trimm, J. L., G. Salama and J. J. Abramson (1986). "Sulfhydryl oxidation induces rapid calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles." *J Biol Chem* 261(34): 16092-8.
- Troyano, A., P. Sancho, C. Fernandez, E. de Blas, P. Bernardi and P. Aller (2003). "The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells." *Cell Death Differ* 10(8): 889-98.
- Trush, M. A., E. G. Mimnaugh and T. E. Gram (1982). "Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity." *Biochem Pharmacol* 31(21): 3335-46.
- Tsai, K., S. S. Wang, T. S. Chen, C. W. Kong, F. Y. Chang, S. D. Lee and F. J. Lu (1998). "Oxidative stress: an important phenomenon with pathogenetic significance in the progression of acute pancreatitis." *Gut* 42(6): 850-5.
- Tsuji, N., N. Watanabe, T. Okamoto and Y. Niitsu (1994). "Specific interaction of pancreatic elastase and leucocytes to produce oxygen radicals and its implication in pancreatitis." *Gut* 35(11): 1659-64.
- Tsukahara, Y., Y. Horita, K. Anan, T. Morisaki, M. Tanaka and M. Torisu (1996). "Role of nitric oxide derived from alveolar macrophages in the early phase of acute pancreatitis." *J Surg Res* 66(1): 43-50.
- Tsukahara, Y., T. Morisaki, Y. Horita, M. Torisu and M. Tanaka (1999). "Phospholipase A2 mediates nitric oxide production by alveolar macrophages and acute lung injury in pancreatitis." *Ann Surg* 229(3): 385-92.
- Uhl, W., A. Warshaw, C. Imrie, C. Bassi, C. J. McKay, P. G. Lankisch, R. Carter, E. Di Magno, P. A. Banks, D. C. Whitcomb, C. Dervenis, C. D. Ulrich, K. Satake, P. Ghaneh, W. Hartwig, J. Werner, G. McEntee, J. P. Neoptolemos and M. W. Buchler (2002). "IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis." *Pancreatology* 2(6): 565-73.
- Umeno, Y., J. Otsuka, E. Sasatomi and K. Irie (2000). "Development of colonic necrosis following severe acute pancreatitis." *Intern Med* 39(4): 305-8.
- Urñuuela, A., S. Sevillano, A. M. de la Mano, M. A. Manso, A. Orfao and I. de Dios (2002). "Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction." *Biochim Biophys Acta* 1588(2): 159-64.
- Vairetti, M., A. Ferrigno, R. Bertone, P. Richelmi, F. Berte and I. Freitas (2005). "Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes." *Biochim Biophys Acta* 1740(3): 367-74.
- Van Acker, G. J., A. K. Saluja, L. Bhagat, V. P. Singh, A. M. Song and M. L. Steer (2002). "Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(3): G794-800.
- van Engeland, M., L. J. Nieland, F. C. Ramaekers, B. Schutte and C. P. Reutelingsperger (1998). "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." *Cytometry* 31(1): 1-9.
- Vassalli, P. (1992). "The pathophysiology of tumor necrosis factors." *Annu Rev Immunol* 10: 411-52.
- Vernon, L. P. and J. D. Bell (1992). "Membrane structure, toxins and phospholipase A2 activity." *Pharmacol Ther* 54(3): 269-95.
- Viedma, J. A., M. Perez-Mateo, J. E. Dominguez and F. Carballo (1992). "Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A." *Gut* 33(9): 1264-7.
- Viguerie, N., V. Bertrand, M. Dufresne, E. Davis, S. Lefort, N. Vita, N. Vaysse, L. Pradayrol and M. J. Bastie (1994). "Interleukin-6 regulation of CCK/gastrin receptors and amylase secretion in a rat pancreatic acinar cell line (AR4-2J)." *Eur Cytokine Netw* 5(5): 433-40.

- Vina, J., M. Vento, F. Garcia-Sala, I. R. Puertes, E. Gasco, J. Sastre, M. Asensi and F. V. Pallardo (1995). "L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency." *Am J Clin Nutr* 61(5): 1067-9.
- Viña, J., R. Hems and H. A. Krebs (1978). "Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes." *Biochemical Journal* 170(3): 627-630.
- Viña, J., G. T. Saez, D. Wiggins, A. F. Roberts, R. Hems and H. A. Krebs (1983). "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes." *Biochem J* 212(1): 39-44.
- Viña, J., J. R. Viña and G. T. Saez (1986). "Glutathione: metabolism and physiological functions." *Life Chem. Rep.* 4: 1-35.
- Viña, J., C. Pérez, T. Furukawa, M. Palacín and J. R. Viña (1989a). "Effect of oral glutathione on hepatic glutathione levels in rats and mice." *Br. J. Nutr.* 62: 683-691.
- Viña, J., E. Gascó, F. V. Pallardó, J. Sastre, J. M. Estrela and F. Rodrigo (1990). Effect of physiological changes in cystathionase activity on amino acid and glutathione metabolism in rat fetus. *Endocrine and biochemical development of the fetus and neonate*. J. M. Cuezva and A. M. Pascual-Leone. Nueva York., Editorial Plenum Press: 283-286.
- Viña, J., A. Gimenez, I. R. Puertes, E. Gasco and J. R. Vina (1992a). "Impairment of cysteine synthesis from methionine in rats exposed to surgical stress." *Br J Nutr* 68(2): 421-9.
- Viña, J., A. Gimenez, I. R. Puertes, E. Gasco and J. R. Vina (1992b). "Impairment of cysteine synthesis from methionine in rats exposed to surgical stress." *Br J Nutr* 68(2): 421-9.
- Viña, J. R., M. Palacin, I. R. Puertes, R. Hernandez and J. Vina (1989b). "Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation." *Am J Physiol* 257(6 Pt 1): E916-22.
- Viña, J. R., F. V. Pallardo, C. García, A. Triguero, J. A. Martín, J. Boix, A. Pellín, J. Viña and J. Sastre (1996). Metabolic implications of beta-cystathionase activity in mammals. *Methionine metabolism. Molecular mechanism and clinical implications*. J. M. Mato and A. Caballero. Madrid, CSIC, Jarpoy Editores: 111-120.
- Vladimirov, Y. A. (1986). Free radical lipids peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation and biological consequences. *Free radicals, aging and degenerative diseases*. J. E. Johnson, R. Walford, J. Harman, J. Miquel and A. R. Liss: 141-195.
- Voehringer, D. W., D. J. McConkey, T. J. McDonnell, S. Brisbay and R. E. Meyn (1998). "Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 2956-60.
- von Sonntag, C. (1994). "Radiation chemistry in the 1990s: pressing questions relating to the areas of radiation biology and environmental research." *Int J Radiat Biol* 65(1): 19-26.
- Wada, T. and J. M. Penninger (2004). "Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation." *Oncogene* 23(16): 2838-49.
- Waetzig, G. H., D. Seegert, P. Rosenstiel, S. Nikolaus and S. Schreiber (2002). "p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease." *J Immunol* 168(10): 5342-51.
- Wagner, A. C., W. Metzler, T. Hofken, H. Weber and B. Goke (1999). "p38 map kinase is expressed in the pancreas and is immediately activated following cerulein hyperstimulation." *Digestion* 60(1): 41-7.
- Wagner, A. C., L. Mazzucchelli, M. Miller, A. M. Camoratto and B. Goke (2000). "CEP-1347 inhibits caerulein-induced rat pancreatic JNK activation and ameliorates caerulein pancreatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(1): G165-72.
- Wahllander, A., S. Soboll, H. Sies, I. Linke and M. Muller (1979). "Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases." *FEBS Lett* 97(1): 138-40.

- Walker, N. I., C. M. Winterford and J. F. Kerr (1992). "Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. II. Duct and stromal cell proliferation, differentiation, and deletion." *Pancreas* 7(4): 420-34.
- Warshaw, A. L., P. B. Lesser, M. Rie and D. J. Cullen (1975). "The pathogenesis of pulmonary edema in acute pancreatitis." *Ann Surg* 182(4): 505-10.
- Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud and J. A. Cooper (1997). "Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2." *Embo J* 16(8): 1909-20.
- Watanabe, O., F. M. Baccino, M. L. Steer and J. Meldolesi (1984). "Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis." *Am J Physiol* 246(4 Pt 1): G457-67.
- Webster, K. A., H. Prentice and N. H. Bishopric (2001). "Oxidation of zinc finger transcription factors: physiological consequences." *Antioxid Redox Signal* 3(4): 535-48.
- Weinbroum, A., V. G. Nielsen, S. Tan, S. Gelman, S. Matalon, K. A. Skinner, E. Bradley, Jr. and D. A. Parks (1995). "Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase." *Am J Physiol* 268(6 Pt 1): G988-96.
- Weisger, R. A. and I. Fridovich (1973). "Superoxide dismutase: organella specificity." *Journal of Biological Chemistry* 248: 3582-3591.
- Weston, C. R. and R. J. Davis (2002). "The JNK signal transduction pathway." *Curr Opin Genet Dev* 12(1): 14-21.
- Whitcomb, D. C. (1999). "Early trypsinogen activation in acute pancreatitis." *Gastroenterology* 116(3): 770-2.
- White, M. J. and F. R. Heckler (1990). "Oxygen free radicals and wound healing." *Clin Plast Surg* 17(3): 473-84.
- Willemer, S., C. O. Feddersen, W. Karges and G. Adler (1991). "Lung injury in acute experimental pancreatitis in rats. I. Morphological studies." *Int J Pancreatol* 8(4): 305-21.
- Williams, J. A., M. D. Sans, M. Tashiro, C. Schafer, M. J. Bragado and A. Dabrowski (2002). "Cholecystokinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells." *Pharmacol Toxicol* 91(6): 297-303.
- Wilson, C. and C. Imrie (1991). Systemic effects of acute pancreatitis. *Pancreatic disease. Progress and prospects*. J. C. I. CW. Londres, Springer-Verlag: 287-297.
- Wilson, P. G., M. Manji and J. P. Neoptolemos (1998). "Acute pancreatitis as a model of sepsis." *J Antimicrob Chemother* 41 Suppl A: 51-63.
- Windsor, J. A. and H. Hammodat (2000). "Metabolic management of severe acute pancreatitis." *World J Surg* 24(6): 664-72.
- Xia, M., R. Dempski and R. Hille (1999). "The reductive half-reaction of xanthine oxidase. Reaction with aldehyde substrates and identification of the catalytically labile oxygen." *J Biol Chem* 274(6): 3323-30.
- Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis and M. E. Greenberg (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." *Science* 270(5240): 1326-31.
- Yamauchi, J., K. Shibuya, M. Sunamura, K. Arai, H. Shimamura, F. Motoi, K. Takeda and S. Matsuno (2001). "Cytokine modulation in acute pancreatitis." *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8(3): 195-203.
- Yang, D. D., D. Conze, A. J. Whitmarsh, T. Barrett, R. J. Davis, M. Rincon and R. A. Flavell (1998a). "Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2." *Immunity* 9(4): 575-85.

- Yang, H., Y. Zeng, T. D. Lee, Y. Yang, X. Ou, L. Chen, M. Haque, R. Rippe and S. C. Lu (2002). "Role of AP-1 in the coordinate induction of rat glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase by tert-butylhydroquinone." *J Biol Chem* 277(38): 35232-9.
- Yang, J., W. Denham, K. J. Tracey, H. Wang, A. A. Kramer, K. F. Salhab and J. Norman (1998b). "The physiologic consequences of macrophage pacification during severe acute pancreatitis." *Shock* 10(3): 169-75.
- Yoshioka, A., Y. Yamaya, S. Saiki, M. Kanemoto, G. Hirose, J. Beesley and D. Pleasure (2000). "Non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors mediate oxygen-glucose deprivation-induced oligodendroglial injury." *Brain Res* 854(1-2): 207-15.
- Yu, H., H. Klonowski-Stumpe and R. Luthen (2002). "Glutathione might exert an important function in cerulein-stimulated amylase release in isolated rat pancreatic acini." *Pancreas* 24(1): 53-62.
- Zaborina, O., N. Dhiman, M. Ling Chen, J. Kostal, I. A. Holder and A. M. Chakrabarty (2000). "Secreted products of a nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strain induce two modes of macrophage killing: external-ATP-dependent, P2Z-receptor-mediated necrosis and ATP-independent, caspase-mediated apoptosis." *Microbiology* 146 (Pt 10): 2521-30.
- Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, C. Zanin, J. L. Vayssiere, P. X. Petit and G. Kroemer (1995). "Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo." *J Exp Med* 181(5): 1661-72.
- Zhang, Y. and D. Reinberg (2001). "Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails." *Genes Dev* 15(18): 2343-60.
- Zhang, Z., D. R. Blake, C. R. Stevens, J. M. Kanczler, P. G. Winyard, M. C. Symons, M. Benboubetra and R. Harrison (1998). "A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: the role of NADH as an electron donor." *Free Radic Res* 28(2): 151-64.
- Zhou, W., B. A. Levine and M. S. Olson (1993). "Platelet-activating factor: a mediator of pancreatic inflammation during cerulein hyperstimulation." *Am J Pathol* 142(5): 1504-12.
- Zimmerman, B. J., D. A. Parks, M. B. Grisham and D. N. Granger (1988). "Allopurinol does not enhance antioxidant properties of extracellular fluid." *Am J Physiol* 255(1 Pt 2): H202-6.
- Zu, Y. L., J. Qi, A. Gilchrist, G. A. Fernandez, D. Vazquez-Abad, D. L. Kreutzer, C. K. Huang and R. I. Sha'afi (1998). "p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation." *J Immunol* 160(4): 1982-9.