

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

MECANISMO DE DEPLECIÓN DE GLUTATIÓN Y PAPEL
DE LA SERÍN/TREONÍN FOSFATASA PP2A EN LA
PANCREATITIS AGUDA

JAVIER ESCOBAR CUBIELLA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 27 de febrer de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. José Viña Ribes
- Dra. Emma Folch Puy
- Dr. Daniel Closa Autet
- Dra. M^a Isabel de Dios
- Dr. Javier Pereda Cervera

Va ser dirigida per:
Dr. Juan Sastre Belloch

©Copyright: Servei de Publicacions
Javier Escobar Cubiella

Dipòsit legal: V-3753-2009
I.S.B.N.: 978-84-370-7509-9

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115

VNIVERSITAT  VALÈNCIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



MECANISMO DE DEPLECIÓN DE GLUTATIÓN Y
PAPEL DE LA SERÍN/TREONÍN FOSFATASA PP2A EN
LA PANCREATITIS AGUDA.

TESIS DOCTORAL presentada por
JAVIER ESCOBAR CUBIELLA

Valencia, 2009

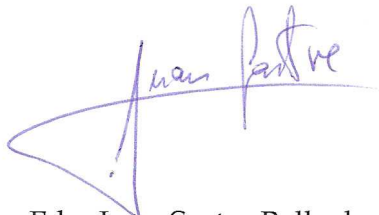
D. Juan Sastre Belloch, Doctor en Farmacia y Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

D. Gerardo López Rodas, Doctor en Química y Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València

D. Luis Sabater Ortí, Doctor en Medicina y Médico Adjunto del Hospital Clínico de Valencia.

CERTIFICAN: Que la memoria titulada: *MECANISMO DE DEPLECIÓN DE GLUTATIÓN Y PAPEL DE LA SERÍN/TREONÍN FOSFATASA PP2A EN LA PANCREATITIS AGUDA*, presentada para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia por el Licenciado en Biología JAVIER ESCOBAR CUBIELLA.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia, a 23 de Diciembre de 2008.



Fdo. Juan Sastre Belloch



Fdo. Luis Sabater Ortí



Fdo. Gerardo López Rodas

LA CONSECUCIÓN DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL HA SIDO POSIBLE GRACIAS A LA FINANCIACIÓN DE LOS SIGUIENTES PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN:

- **Ministerio de Ciencia y Tecnología:
SAF2006-06963.**
- **Ministerio de Ciencia y Tecnología:
SAF2003-05865.**
- **Ministerio de Ciencia y Tecnología:
CSD-2007-0020.**

AGRADECIMIENTOS:

Primero me gustaría dedicarle esta Tesis a mis padres, que son los verdaderos artifices de que hoy por hoy yo esté donde estoy, no solo profesionalmente, si no también como persona. Puedo estar seguro de que todas las virtudes buenas que yo pueda tener las he heredado de ellos, mientras que las malas costumbres las he ido cogiendo por el camino. Papá, Mamá, gracias por todo lo que habeis hecho por mi y por haberme aguantado tantas cosas y por haber dado tantas oportunidades y por no haberme reprochado nunca nada, estando siempre ahí dándome vuestro amor. Podeis estar seguros de que a pesar de que hace ya 13 años que emigré del nido, no hay día que no piense en vosotros y cada día que pasa me siento más cerca de vosotros y os quiero un poco más. Sois los mejores padres que he podido tener y me siento afortunado por ello (Creo que esa es la mayor riqueza que tengo).

Manolin o Don Manuel que ahora eres todo un padrazo, a ti también te la dedico para que veas que ya tienes algo bueno de que hablar acerca de tu hermano. Gracias por haber estado siempre protegiéndome, aunque haya sido a tu manera y creo que aunque lo niegues, en el fondo al menos por un rato estarás orgulloso de tu hermano cada vez que leas esta tesis doctoral.

Marlene, que te voy a decir a ti que me llevas sufriendo desde hace 3 años y te has comido todos los buenos y malos momentos que he tenido durante la realización de este proyecto, has sido mi compañera de viaje fiel y has aguantado contra viento y marea como esa brava remera que tu eres. No cambies nunca. E por suposto, não me posso esquecer da tua mãe, que leva em vários meses preguntandome pela escrita do livro. Para meu é uma honra que tua mãe este tão orgulhosa de mim .

Me gustaría agradecerle a toda la gente buena que conozco el que hayan aguantado mi forma de ser y de vida, a mi familia, a la familia de Patxi, a mis amigos de Castro Urdiales (el pueblo mas bonito del norte de

España, a los de Santiago de Compostela (La ciudad de mi vida), a la gente de Ginebra y a la de Varsovia (Dos inolvidables experiencias). Prometo cumplir todos los viajes pendientes.

También me gustaría agradecerle a todos los integrantes de la U.EM: Mari, Elena, Eva , Consuelo, Nancy, Ana, Jelena, Jose Luis, Mari Lele, Vladi, Fabian, Carmen, Rubén, Soraya, Chelo, Gambini, Raul y a los de Farmacia: Inma, Ana flores, Pilar, Mavi, Jose, Vanina, Javier, Tere, Paula, Sonia, Miguel, Pedro, María, María Benlloch, Fátima Angel, Julián, Salva, y a los de mi grupo: Max Vento, Raquel, Pain, Javi y Alessandro. Gracias por todo vuestro apoyo y vuestro ánimo cuando lo he necesitado.

A Fede y Pepe deciros que es un honor conoceros y gracias sobre todo por lo buenos y amables que sois siempre conmigo. Pepe, gracias por acercarme a una inminencia como Krebs.

Y a la profesora Teresa Varea, porque dos días de tu inestimable ayuda, me solucionaron un par de meses de trabajo, muchas gracias y si puedo ayudarte cuenta conmigo...

Gracias a mis directores de Tesis Juan, Gerardo y Luis por toda su ayuda y consejos durante estos años. Juan, estoy orgulloso de poder trabajar contigo.

Por último me gustaría recordar en esta dedicatoria a dos buenos amigos que nos han dejado durante el período de escritura de esta Tesis, Teresa y David, que en algunos momentos me han hecho reflexionar y pensar sobre cosas transcendentales como la vida y la muerte. Ojalá! todo el esfuerzo que ponemos mucha gente sirva un día para salvar más vidas de las que se salvan hoy por hoy. Este es el verdadero objetivo de muchos de nosotros y el cual nos debe motivar para seguir adelante cuando las cosas van mal, y disfrutar de todo cuanto nos rodea cuando y cuanto podamos.....

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS. VIII

ÍNDICE DE TABLAS. XIV

ÍNDICE DE ABREVIATURAS. XV

I-INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTO, PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA
PANCREATITIS AGUDA.2

2. MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN.8

2.1. Especies reactivas de nitrógeno (RNS) y oxígeno (ROS). 11

2.2. Sistemas de defensa contra los radicales libres. 13

2.3. Citoquinas. 23

3. PROTEASAS Y MUERTE CELULAR.29

3.1. Tipos de proteasas. 32

3.2. Implicación de las proteasas y peptidasas en la muerte celular y en el
desarrollo de la pancreatitis aguda. 40

4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN LA
INFLAMACIÓN AGUDA.42

4.1. Proteín quinasas activadas por mitógenos, MAP quinasas (MAPK). 45

ÍNDICE

4.2. Regulación de la señalización por fosforilación reversible. Fosfatasa y modulación de las MAPK.	53
4.3. Papel de las MAP quinasas y fosfatasa en la pancreatitis aguda.	63
5. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA CASCADA INFLAMATORIA.	64
6. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA MEDIANTE PENTOXIFILINA.	67

II-OBJETIVOS

III-MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.	- 73 -
1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.	- 73 -
1.2. Aparatos.	- 74 -
1.3. Reactivos.	- 75 -
2. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN.	- 78 -
2.1. Modelo experimental de pancreatitis aguda necrótica <i>in vivo</i> en ratas. ...	- 78 -
2.2. Modelo experimental de pancreatitis aguda inducida porceruleína <i>in vivo</i> ratas.	- 80 -
2.3. Modelo de cultivo de células AR42J <i>in vitro</i>	- 81 -

ÍNDICE

3. MÉTODOS.	- 83 -
3.1. Determinación de proteínas.	- 83 -
3.2. Determinación de glutatión reducido.	- 84 -
3.3. <i>Western blotting</i>	- 86 -
3.4. Inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP).	- 91 -
3.5. Actividad de la ribonucleasa pancreática.	- 97 -
3.6. Tasa de degradación de glutatión reducido en el páncreas.	- 99 -
3.7. Tasa de formación de glutamato y cisteína en el páncreas.	- 102 -
3.8. Actividad de la γ -glutamil transpeptidasa.	- 105 -
3.9. Actividad de la carboxipeptidasa B pancreática.	- 107 -
3.10. Tasa de degradación de glutatión reducido en presencia de la tripsina o de la carboxipeptidasa B.	- 109 -
3.11. Cromatografía de afinidad.	- 109 -
3.12. Identificación proteica de los eluatos cromatográficos. MALDI-TOF y huella peptídica.	- 122 -
3.13. Actividad proteín fosfatasa.	- 125 -
3.14. Determinación de la concentración de AMPc, <i>in vitro</i>	- 134 -

ÍNDICE

- 3.15.Determinación de la viabilidad de las células AR42J mediante el ensayo MTT. - 139 -
- 3.16.Efecto de la pentoxifilina sobre la fosforilación de ERK1/2 inducida por taurocolato en células AR42J *in vitro*. - 140 -
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.- 141 -

IV-RESULTADOS

1. GLUTAMIL CISTEÍNA LIGASA (GCL) Y GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) EN LA PANCREATITIS AGUDA.143
- 1.1. Niveles de GSH en páncreas en el transcurso de la pancreatitis aguda. 143
- 1.2. Expresión proteica de la subunidad catalítica de la GCL durante la pancreatitis aguda. 144
- 1.3. Unión del factor transcripcional c-MYC a los promotores de los genes de la GCL. 145
- 1.4. Activación de la vía de c-MYC y de la MAP quinasa ERK 1/2 en la pancreatitis aguda. 146
- 1.5. Actividad citosólica de la ribonucleasa pancreática en la pancreatitis aguda. 147
2. DEGRADACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN PÁNCREAS EN LA PANCREATITIS AGUDA NECRÓTICA.149

ÍNDICE

2.1. Tasa de degradación de glutatión reducido en homogenados de páncreas de ratas control y con PA necrótica.	149
2.2. Tasas de formación de glutamato y de cisteína en homogenados de páncreas de ratas control y con pancreatitis aguda necrótica.	150
2.3. Actividad de la γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT) en homogenados de páncreas. Efecto del AEBSE, la acivicina y de la ultracentrifugación a 200.000 <i>xg</i>	152
2.4. Tasa de degradación de glutatión reducido en extractos citosólicos de páncreas de ratas control y de ratas con PA necrótica.	155
2.5. Tasas de formación de glutamato y cisteína en extractos citosólicos de páncreas de ratas control y con PA necrótica.	158
3. IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES ENZIMAS RESPONSABLES DE LA DEGRADACIÓN DE GSH EN LA AGUDA NECRÓTICA.	160
3.1. Análisis de la carboxipeptidasa B y de la tripsina como posibles efectoras de la degradación de GSH en la pancreatitis aguda necrótica.	161
3.2. Purificación de proteínas afines al glutatión y de proteínas afines al AEBSE afinidad en extractos citosólicos de ratas con pancreatitis aguda. Análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF).	163
4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE MEK 1/2 Y ACTIVIDADES PROTEÍN FOSFATAS DURANTE LA PANCREATITIS AGUDA. EFECTO DE LA PENTOXIFILINA.	168

ÍNDICE

4.1. Activación de la MAP quinasa quinasa MEK 1/2 en la pancreatitis agudaneocrótica. Efecto del tratamiento con pentoxifilina sobre la fosforilación de MEK 1/2.	168
4.2. Actividades de las tirosín fosfatasas de especificidad dual, MKP2 y MKP3 y de las tirosín fosfatasas citosólicas en la pancreatitis aguda.	170
4.3. Actividades de las serín/treonín fosfatasas PP2A, PP2B (Calcineurina) y PP2C durante la pancreatitis aguda necrótica experimental.	173
4.4. Efecto de la pentoxifilina sobre la actividad de las serín/treonín fosfatasas en la pancreatitis aguda necrótica.	175
4.5. Actividad PP2A <i>in vitro</i> en células AR42J. Efectos del taurocolato, de la pentoxifilina y del dibutiril cíclico AMP.	177
4.6. Efectos de la pentoxifilina sobre la fosforilación de ERK 1/2 inducida por taurocolato en células AR42J.	182
5. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LOS GENES PRO-INFLAMATORIOS EN LA PANCREATITIS AGUDA. MODULACIÓN POR PENTOXIFILINA.	182

IV-DISCUSIÓN

1. INDUCCIÓN INEFICAZ DE LA GLUTAMIL CISTEÍNA LIGASA EN LA PANCREATITIS AGUDA NECRÓTICA.	190
1.1. Disminución de los niveles de glutatión reducido durante la pancreatitis aguda.	190

ÍNDICE

1.2. Papel de la glutamato cisteína ligasa en la depleción de glutatión en la pancreatitis aguda.	191
1.3. Actividad citosólica de la ribonucleasa pancreática en la pancreatitis aguda.	192
2. DEGRADACIÓN DE GSH MEDIANTE HIDRÓLISIS DURANTE LA PANCREATITIS AGUDA.....	195
2.1. Identificación de posibles responsables de la hidrólisis de GSH en la PA necrótica.	198
3. BASES MOLECULARES DE LA CASCADA INFLAMATORIA EN EN LA PANCREATITIS AGUDA.	205
4. MODULACIÓN DE LA CASCADA INFLAMATORIA DE LA PANCREATITIS AGUDA CON PENTOXIFILINA.	226
4.1. Efecto de la pentoxifilina sobre las serín/treonín fosfatasas.	214
4.2. Efectos epigenéticos de la pentoxifilina en el transcurso de la pancreatitis aguda experimental. Remodelación de la cromatina.	216

VI-CONCLUSIONES

VII-BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Activación de las enzimas digestivas en el lumen duodenal.	3
Figura 2.- Iniciación de la pancreatitis aguda. Teoría de la colocalización en células acinares.	5
Figura 3.- Patofisiología de la pancreatitis aguda (SIRS y MODS).	7
Figura 4.- Fenómenos que acontecen en el proceso inflamatorio debido a una agresión tisular.	9
Figura 5.- Papel de los radicales libres en la inflamación.	12
Figura 6.- Defensa antioxidante enzimática (SOD, GPx y CAT).	14
Figura 7.- Estructura del glutatión reducido y oxidado.	16
Figura 8.- Ciclo redox del glutatión.	17
Figura 9.- Ciclo del γ -glutamilo.	21
Figura 10.- Receptores de TNF- α y mecanismo de acción intracelular.	26
Figura 11.- Acción de las hidrolasas.	30
Figura 12.- Hidrólisis producida por las esterasas.	31
Figura 13.- Hidrólisis producida por las fosfatasas.	31
Figura 14.- Hidrólisis producida por las peptidasas.	32
Figura 15.- Principales vías de transducción de diferentes estímulos extracelulares.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 16.- Representación de uno de los modelos de activación de GPCRs.	44
Figura 17.- Esquema general de las vías de las MAP quininas.	46
Figura 18.- Vía de señalización de ERK 1/2.	48
Figura 19.- Vía de señalización de JNK.	50
Figura 20.- Vía de señalización de p38.	52
Figura 21.- Clases y dominios de las tirosín fosfatasas.	60
Figura 22.- Regulación de las MAPK por las DSPs.	61
Figura 23.- Estructura de la Pentoxifilina.	67
Figura 24.- Modelo de pancreatitis necrótica inducida por taurocolato.	- 80 -
Figura 25.- Esquema de la inducción de pancreatitis con ceruleína en ratas. .-	- 81 -
Figura 26.- Esquema de la técnica del <i>Western blotting</i>	- 90 -
Figura 27.- Esquema de la cromatografía de afinidad.	- 113 -
Figura 28.- Revelado de la cromatografía en capa fina del AEBSF biotinilado.	- 118 -
Figura 29.- Evolución de los niveles de glutatión reducido (GSH) en el transcurso de la pancreatitis aguda.	143
Figura 30.- Niveles proteicos de la subunidad catalítica de la GCL, HS-GCL durante la pancreatitis aguda.	144

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 31.- Unión del factor transcripcional c-MYC a los promotores de las subunidades catalítica (A) y reguladora (B) de la GCL en la pancreatitis aguda edematosa. 145
- Figura 32.- Unión del factor transcripcional c-MYC a los promotores de las subunidades catalítica (A) y reguladora (B) de la GCL en la pancreatitis aguda necrótica. 146
- Figura 33.- Determinación de la expresión proteica de c-MYC, c-MYC fosforilado y ERK 1/2 fosforilado en el en el transcurso de la PA necrótica (A) y PA edematosa (B). 147
- Figura 34.- Actividad citosólica de la ribonucleasa pancreática en la pancreatitis aguda. 148
- Figura 35.- Tasa de degradación de glutatión reducido en homogenados de páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, en presencia y ausencia la presencia de AEBSF. 149
- Figura 36.- Tasa de formación de glutamato en homogenados páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, en presencia y ausencia de AEBSF. 150
- Figura 37.- Tasa de formación de cisteína en homogenados de páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, en presencia y ausencia de AEBSF. 151
- Figura 38.- Actividad de la γ -glutamyl transpeptidasa en homogenados de páncreas de rata. 153
- Figura 39.- Eliminación de la Actividad de la γ -glutamyl transpeptidasa en homogenados de páncreas de rata. 155

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 40.- Tasa de degradación de glutatión reducido en extractos citosólicos de páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, en presencia y ausencia de AEBSF. 156
- Figura 41.- Tasa de degradación de glutatión reducido endógeno en extractos citosólicos de páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, en presencia y ausencia de AEBSF. 157
- Figura 42.- Tasa de formación de glutamato en extractos citosólicos de páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, en presencia y ausencia de AEBSF. 158
- Figura 43.- Tasa de formación de cisteína en extractos citosólicos de páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, en presencia y ausencia de AEBSF. 159
- Figura 44.- Actividad de la carboxipeptidasa B pura. 161
- Figura 45.- Electroforesis e identificación por MALDI-TOF de proteínas presentes en extractos citosólicos de páncreas de ratas con PA necrótica afines al GSH. 166
- Figura 46.- Tasa de degradación de GSH detectada en eluatos comatográficos de proteínas afines al GSH provenientes de extractos citosólicos de páncreas de ratas con pancreatitis aguda necrótica. 167
- Figura 47.- Activación de la MAP quinasa quinasa MEK 1/2 en el transcurso de la PA aguda experimental inducida por taurocolato. 169
- Figura 48.- Efecto del tratamiento de la PA necrótica con pentoxifilina sobre la fosforilación de MEK 1/2. 169
- Figura 49.- Actividad de la Fosfatasa de especificidad dual MKP2 en la pancreatitis aguda necrótica. 170

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 50.- Actividad de la fosfatasa de especificidad dual MKP3 en la pancreatitis aguda necrótica.	171
Figura 51.- Actividad tirosín fosfatasa durante la pancreatitis aguda necrótica.	172
Figura 52.- Actividad de la serín/treonín fosfatasa PP2A en la pancreatitis aguda necrótica.	174
Figura 53.- Actividad de la serín/treonín fosfatasa PP2B en la pancreatitis aguda necrótica.	174
Figura 54.- Actividad de la serín/treonín fosfatasa PP2C en la pancreatitis aguda necrótica.	175
Figura 55.- Efecto de la pentoxifilina sobre la actividad, PP2A, PP2B (calcineurina) y PP2C en la pancreatitis aguda necrótica.	176
Figura 56.- Curva dosis respuesta de taurocolato sódico en células AR42J.	178
Figura 57.- Evolución de la actividad PP2A en células AR42J incubadas con taurocolato sódico al 0,3%.	179
Figura 58.- Efecto de la pentoxifilina y del dibutil AMP cíclico sobre la actividad PP2A en células AR42J incubadas con taurocolato sódico al 0,3%.	180
Figura 59.- Efecto de la pentoxifilina y del dibutil AMP cíclico sobre la concentración de AMPc en células AR42J incubadas con taurocolato sódico al 0,3%.	181
Figura 60.- Fosforilación de ERK 1/2 en células AR42J incubadas con taurocolato sódico.....	182

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 61.- Prevención de la pentoxifilina del reclutamiento de deacetilasas y acetiltransferasas al promotor de <i>egr-1</i>	183
Figura 62.- Prevención de la pentoxifilina del reclutamiento de deacetilasas y acetiltransferasas al promotor de <i>icam-1</i>	184
Figura 63.- Prevención de la pentoxifilina del reclutamiento de deacetilasas y acetiltransferasas al promotor de <i>inos2</i>	185
Figura 64.- Prevención de la pentoxifilina del reclutamiento de deacetilasas y acetiltransferasas al promotor de <i>tnf-α</i>	186

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Moléculas Implicadas en el proceso inflamatorio.	10
Tabla 2.- Especificidad de las MKPs por las MAPK (Owens y Keyse, 2007). ...	62
Tabla 3.- Anticuerpos utilizados en los western blotting.	- 91 -
Tabla 4.- Anticuerpos utilizados en los ensayos de ChIP.	- 96 -
Tabla 5.- Condiciones de amplificación en el ChIP.	- 96 -
Tabla 6.- Oligonucleótidos específicos utilizados para los ensayos de ChIP. -	97 -
Tabla 7.- Inhibidores utilizados en el tampón de homogenización para la determinación de la tasa de degradación de GSH en homogenados y extractos citosólicos de páncreas de rata.	- 102 -
Tabla 8.- Efecto de inhibidores de fosfatasas sobre la actividad de las tirosín fosfatasas (PTPs) y sobre ser/tre fosfatasas (PPPs).	- 128 -
Tabla 9.- Resumen de la adición de los distintos componentes de reacción en la placa del kit para la detrerminaciúón de la concentración de AMPc.	- 138 -
Tabla 10.- Actividad de la γ -GT en las condiciones óptimas para la detección de la tasa de degradación de GSH.	154
Tabla 11.- Determinación de la tasa de degradación de GSH producida por la carboxipeptidasa B y la tripsina.	162
Tabla 12.- Identificación por MALDI-TOF de proteínas presentes en extractos citosólicos de páncreas de ratas con PA necrótica afines al GSH.	164

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 13.- Identificación por MALDI-TOF de proteínas presentes en extractos citosólicos de páncreas de ratas con PA necrótica afines al AEBSF.	165
---	-----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ac:	Acetilación.
AChE:	Acetilcolinesterasa.
Ac CoA:	Acetil coenzima A.
ADN:	Ácido dexosirribonucleico.
ADP:	Adenosin difosfato.
AEBSF:	2,4-Aminoetil bencenosulfonil fluoruro.
AGAT:	L-arginina: glicina amidino transferasa.
APACHE:	<i>Acute physiology and chronic health evaluation.</i>
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico.
AP-1:	Proteína activadora 1.
Arg:	Arginina.
ARN:	Ácido ribonucleico.
ARNm:	ARN mensajero.
ARNt:	ARN de transferencia .
ARID 4B:	<i>AT-rich interactive domain 4B.</i>
ASK1:	Quinasa 1-reguladora de la señal de apoptosis.
Asp:	Asparragina.
ATF-2:	factor de activación de la transcripción 2.
ATP:	adenosín trifosfato.
B:	Unión de la acetilcolinesterasa.
B* ₀ :	Máxima unión de la acetilcolinesterasa.
BSA:	Suero bovino fetal.
BSO:	L-Butionina-sulfoximina.
BSO:	Butionil sulfoximina.
BSA:	Suero bovino fetal
Ca ²⁺ :	Ión calcio.
CaMPKII:	Protein quinasa II Ca ²⁺ /calmodulina dependiente.
CAT:	Catalasa.
CBP:	Proteína de unión a CREB.
CCK:	Colecistoquinina.
CDP571:	Anticuerpo humano TNF-alpha.
C/EBP:	Proteína delta de Unión al Potenciador CCAAT.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Células G:	Células productoras de gastrina.
Células pp:	Células productoras de péptido pancreático.
CHES:	Ácido 2-(Cyclohexylamino)etanosulfónico .
CID:	Coagulación intravascular diseminada.
c-Fos:	Oncogén aislado del virus <i>Finkel-Biskis-Jinkins</i> de osteosarcoma murino.
ChIP:	Inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina.
cIR:	Inhibidor de la ribonucleasa.
c-jun:	Oncogén 17 (<i>jun-nana</i>) aislado de sarcoma de aves.
C-MYC:	Oncogén aislado del virus de la <i>mielocitomatosis</i> aviar.
CNI-1493:	Guanilhidrazona tetravalente.
CO ₂ :	Dióxido de Carbono.
CPB:	Carboxipeptidasa pancreática B.
CPRE:	Colangiopancreatografía retrógrada
CREB:	elemento de unión en respuesta a AMPc.
CT1:	Transportador de creatina.
Cys:	Cisteína.
Cu:	Cobre.
dbAMPc:	dibutiril adenenosin monofosfato cíclico.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
D.O:	Densidad óptica.
DSP:	Fosfatasas de especificidad dual.
DTT:	L-Dithiotreitol.
ECACC:	European Collection of Cell Cultures.
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético sal disódica.
EGTA:	Ácido glicol eter diaminotetraacético
EF2:	Factor de elongación 2.
EIA:	Inmunoensayo enzimático.
Egr-1:	Gen de crecimiento de respuesta temprana 1.
Elk-1:	Gen similar a Ets (<i>Extrasequences</i>) 1.
ERK:	Quinasa regulada por señales extracelulares.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

E64:	trans-Epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano.
FAD:	Flavín adenín dinucleótido.
Fas:	Receptor de membrana CD95.
Fe ²⁺ :	Ión ferroso.
Fe ³⁺ :	Ión férrico.
FOXO:	Familia de factores de transcripción “Forkhead”.
GAA:	Ácido guanidinoacético.
GAMT:	Guanidinoacético metil transferasa.
GAPDH:	Glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa.
GCL:	Glutamato cisteína ligasa.
γ-GCS:	γ-glutamil cisteína sintetasa.
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.
GPX:	Glutación peroxidasa.
GRx:	Glutaredoxina.
GSH:	Glutación reducido.
GSK3β:	Quinasa glucogeno sintetasa 3β.
GSSG:	Glutación oxidado.
GSTs:	Glutación S-transferasas.
γ-GT:	γ-glutamil transpeptidasa.
GTPasa:	Guanosina trifosfatasa.
H3:	Histona 3.
H4:	Histona 4.
HATs:	Histonas acetil transferasas.
HCl :	Ácido clorhídrico.
HDACs:	Histona deacetilasas.
HDMTs:	Histona dimetilasas.
HEAT:	Huntintong.elongation-A-subunit.TOR.
HePTP:	Tirosin fosfatasa hematopoyética.
His:	Histidina.
HO ₂ ·:	Hidroperóxido
H ₂ O:	Agua.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno.
HMTs:	Histona metiltransferasas.
HNO ₂ :	Ácido nitroso.
H ₂ O _{bd} :	Agua bidestilada.
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución.
HRP:	Peroxidasa de rábano picante.
HSP:	Proteína de choque térmico.
HTR:	Proteína con requerimiento de alta temperatura.
ICAM-1:	Molécula de adhesión intercelular 1.
Ig:	Inmunoglobulina.
Ik-B:	Inhibidor del factor nuclear kappa B.
IKK:	Quinasa del factor nuclear kappa B.
ILK:	Quinasa ligada a integrina.
IL:	Interleuquina.
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible.
IP :	Inhidor de proteasas.
IP3R:	Canal receptor inositol 1,4,5-trifosfato.
IT9302:	Péptido homólogo al dominio funcional de IL-10.
JAK:	Quinasa Janus.
JNK:	Quinasa N-terminal de jun.
KC:	Quimioattractante de queratinocitos.
KDa:	Kilodaltons
KIM:	Dominio de interacción con quinasas.
K:	Lisina.
K ⁺ :	Ión potasio.
KOH:	Hidróxido potásico.
LC-MS/MS:	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
LC-MALDI:	Cromatografía líquida con Desorción/ionización de láser asistida por matriz.
LiCl:	Cloruro de litio.
Linfocito TH ₂ :	Linfocito T colaborador tipo 2.
LPS:	Lipopolisacárido.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

L-NAME:	L-arginina metil ester.
M:	Molar.
MALDI-TOF:	Desorción/ionización láser asistida por matriz- Tiempo de vuelo.
MAPK: MAP quinasa.	
MAP-KAP	<i>Mitogen- activated protein kinase-activated protein kinase.</i>
MAPKK o MEK:	MAP quinasa quinasa.
MAPKKK o MEKK:	MAP quinasa quinasa quinasa.
MAP quinasas:	Proteín quinasas activadas por mitógenos.
MCP-1:	Proteína 1 quimioattractante de monocitos.
me:	Metilación.
MEF 2:	<i>Myocyte-specific enhancer-binding factor 2.</i>
MEK:	ERK quinasa.
mg:	Miligramo.
MG-132:	Inhibidor del factor nuclear kappa B.
min:	Minuto.
MIP-2:	Proteína de macrófagos inflamatoria 2.
MKP:	MAP quinasa fosfatasa.
μl:	Microlitro.
ml:	Mililitro
mM:	Milimolar.
μM:	Micromolar.
Mn:	Manganeso.
MODS:	Fracaso multiorgánico.
MOPS:	Ácido 4-Morfolinpropanosulfónico.
MPO:	Mieloperoxidasa.
MTT:	Bromuro-3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazolium.
NAC:	N-acetil cisteína.
NaCl ₂ :	Cloruro sódico.
NaHSO ₃ :	Sulfato sódico.
NADPH:	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato.
NaF:	Fluoruro sódico.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

NFAT:	Factor nuclear de células T activadas.
N:	Normalidad.
ng:	Nanogramo.
NF- κ B:	Factor nuclear kappa B.
NHS-biotina:	N-hydroxysuccinimidobiotina.
nM:	Nanomolar.
nm:	Nanometro.
nmol:	Nanomolar.
No ab:	No anticuerpo.
NO:	Óxido nítrico.
NO ⁺ :	Iones nitrosonio.
NO ₂ ⁻ :	Nitrito.
NO ₃ ⁻ :	Nitratos.
NO ₂ :	Dióxido de nitrógeno.
N ₂ O ₄ :	Tetraóxido de dinitrógeno.
N ₂ O ₃ :	Trióxido de dinitrógeno.
NP-40:	Nonidet o Igepal.
NSB:	Uniones no específicas.
O ₂ :	Oxígeno.
O ₂ ⁻ :	Anión superóxido.
•OH:	Radical hidroxilo.
⁻ OONO:	Peroxinitrito.
PA:	Pancreatitis aguda.
PAC 1:	Fosfatasa de especificidad dual 2.
PAF:	Péptido activador de plaquetas.
PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida.
PAK:	Quinasa activadora Rac/p21.
PAP:	Proteína asociada a la pancreatitis.
PAP-1:	Factor de transcripción similar a <i>AP1 Pombe</i> .
PAR:	Receptor activado por proteasas.
PBS:	Tampón fosfato salino.
PCR:	Polymerase change reaction.
PCR:	Proteína C reactiva.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PDE:	Fosfodiesterasa.
PDPC:	Fosfatasa piruvato deshidrogenada.
PKA:	Protein quinasa A.
PLA ₂ :	Fosfolipasa A ₂ .
pM:	Picomolar.
pmol:	Picomolar.
PPPs:	serin/treonin fosfatasas.
PP1:	Serin/treonin fosfatasa 1.
PP2A:	Serin/treonin fosfatasa A.
PP2B:	Serin/treonin fosfatasa B o calcineurina.
PP2C:	Serin/treonin fosfatasa C.
PTKs:	Proteín tirosin quinastas.
PTPs:	Tirosin fosfatasas.
PTPRR:	Proteín tirosín fosfatasa (tipo receptor R).
PYST1:	MAP quinasa fosfatasa 3.
PUFA:	Ácidos grasos poliinsaturados.
p38:	Proteína quinasa activada por estrés (<i>SAPK</i>).
p21:	Inhibidor 1A de la quinasa dependiente de ciclina.
Rac:	Familia guanosin trifosfatasa Rho.
RAF:	Factor activado por ras.
RNS:	Especies reactivas del nitrógeno.
Rnasa:	Ribonucleasa.
ROS:	Especies reactivas del oxígeno.
RSNO:	Nitrosotioles.
RYR:	Canal receptor rianodina.
RPTP:	Tirosin fosfatasa de membrane (tipo receptor).
SAM:	S-adenosilmetionina.
SAH:	S-adenosilhomocisteína.
SDS:	Sodium dodecil sulfato.
SIDA:	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
Sin3A:	<i>Yeast Switch Independent 3</i> homólogo A.
Sistema ASC:	Sistema de transporte de alanina-serina-cisteína.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

SHP:	Proteína tirosín fosfatasa con un dominio homólogo al Src.
SMAD:	Homólogo de la proteína de droshophila MAD (<i>mothers against decapentaplegic</i>) y de la proteína SMA de <i>c.elegans</i> .
SOD:	Superóxido dismutasa.
SOCS:	Proteínas supresoras de la señal citoquímica.
SP-1:	Proteína de especificidad 1.
SRIS:	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.
Src:	Oncogén del virus del sarcoma de Rous.
STAT:	Señales de transducción y de activadores de la transcripción.
Std:	Estandar.
STEP:	<i>Striatal-enriched tyrosine phosphatase</i> .
SP1:	Proteína de especificidad 1.
T ^a :	Temperatura.
TA:	Actividad total.
TAC:	Tomografía axial computarizada.
TAP:	Péptido de activación del tripsinógeno.
Taq:	<i>Thermus aquaticus</i> .
TBS:	Tampón Tris Salino
TBS-T:	Tampón Tris Salino-tween
TE :	Tampón Tris-EDTA.
TEMED:	etano 1,2-Bis(dimetilamino).
TGF- β :	Factor de transformación del crecimiento beta.
Thr:	Treonín.
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral.
TNFR ₁ :	Receptor del factor de necrosis tumoral de tipo 1.
TNFR ₂ :	Receptor del factor de necrosis tumoral de tipo 2.
TRAIL:	TNF- α ligando inductor de apoptosis
Tris :	Trishidroximetilaminometano.
TRx:	Tiorredoxina.
Tyr:	Tirosina.
VH2:	MAP quinasa fosfatasa 2.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

VH3:	B23 ó fosfatasa de especificidad dual 5.
VH-5:	Fosfatasa de especificidad dual 8.
XO:	Xantina oxidasa.
Zn ²⁺ :	Ión Zinc.

I-INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTO, PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA PANCREATITIS AGUDA.

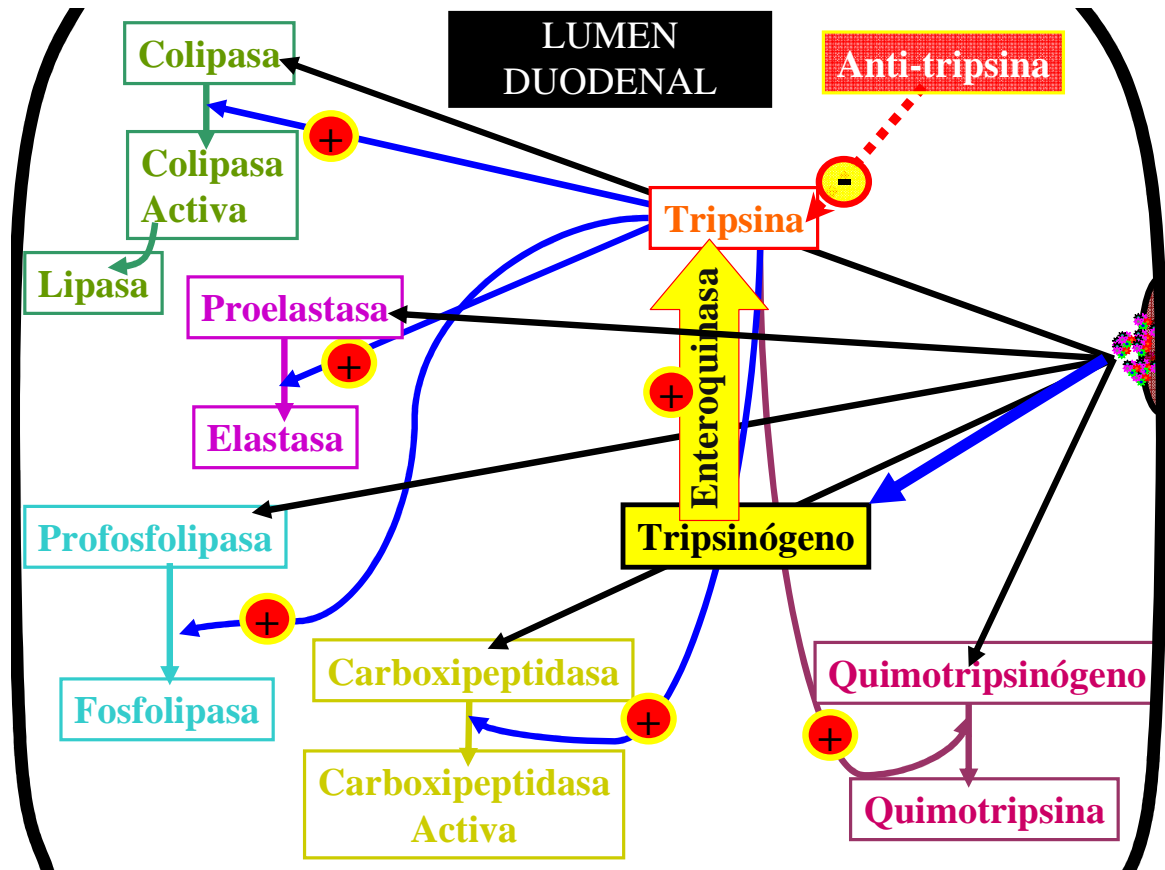
La pancreatitis aguda (PA) es un proceso inflamatorio del páncreas que puede afectar otros tejidos peripancreáticos y tejidos más distantes (Bollen y cols, 2008).

El páncreas exocrino secreta una gran cantidad de enzimas, entre ellas la tripsina, la quimotripsina, las amilasas, las lipasas, las elastasas, la carboxipeptidasa A y B, etc. La gran mayoría de ellas son enzimas líticas secretadas en forma de precursores inactivos (zimógenos), los cuales junto con el inhibidor de la tripsina (α_1 -antitripsina) presente en el jugo pancreático, protegen al páncreas de su autodigestión. Los zimógenos (tripsinógeno, quimotripsinógeno, proelastasa, procarboxipeptidasa A y B, prolipasa y profosfolipasa A2) son sintetizados en el retículo endoplasmático de las células acinares, almacenados dentro de gránulos de secreción y secretados por exocitosis al lumen acinar para ser liberados al duodeno a través del sistema de conductos del páncreas. El principal precursor enzimático es el tripsinógeno; su conversión en tripsina activa se realiza en el duodeno mediante la hidrólisis enzimática por enteroquinasas de la pared intestinal, liberando un péptido llamado péptido de activación del tripsinógeno (TAP).

La tripsina activa más tripsinógeno y también activa al quimotripsinógeno, la pro-carboxipeptidasa y el resto de proenzimas digestivas (figura 1). 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, el almidón y sus componentes para formar glúcidos fermentables (maltosa) y dextrinas no fermentables.

INTRODUCCIÓN

Figura 1.- Activación de las enzimas digestivas en el lumen duodenal.



En 1896, Chiari postuló que la pancreatitis se debía a la autodigestión del páncreas por sucumbir a sus propias propiedades digestivas (Chiari, 1896). Las ideas de Chiari sirvieron 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 bloqueo 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 que el reflujo duodenal, debido a un mal funcionamiento del esfínter de Oddi, pasase al páncreas digiriéndolo (McCutcheon y Race, 1962). Desde la década de los ochenta, sabemos que incluso la obstrucción del conducto pancreático por sí sólo puede desencadenar una

INTRODUCCIÓN

pancreatitis aguda por el aumento de presión intraductal (Austin y cols., 1980).

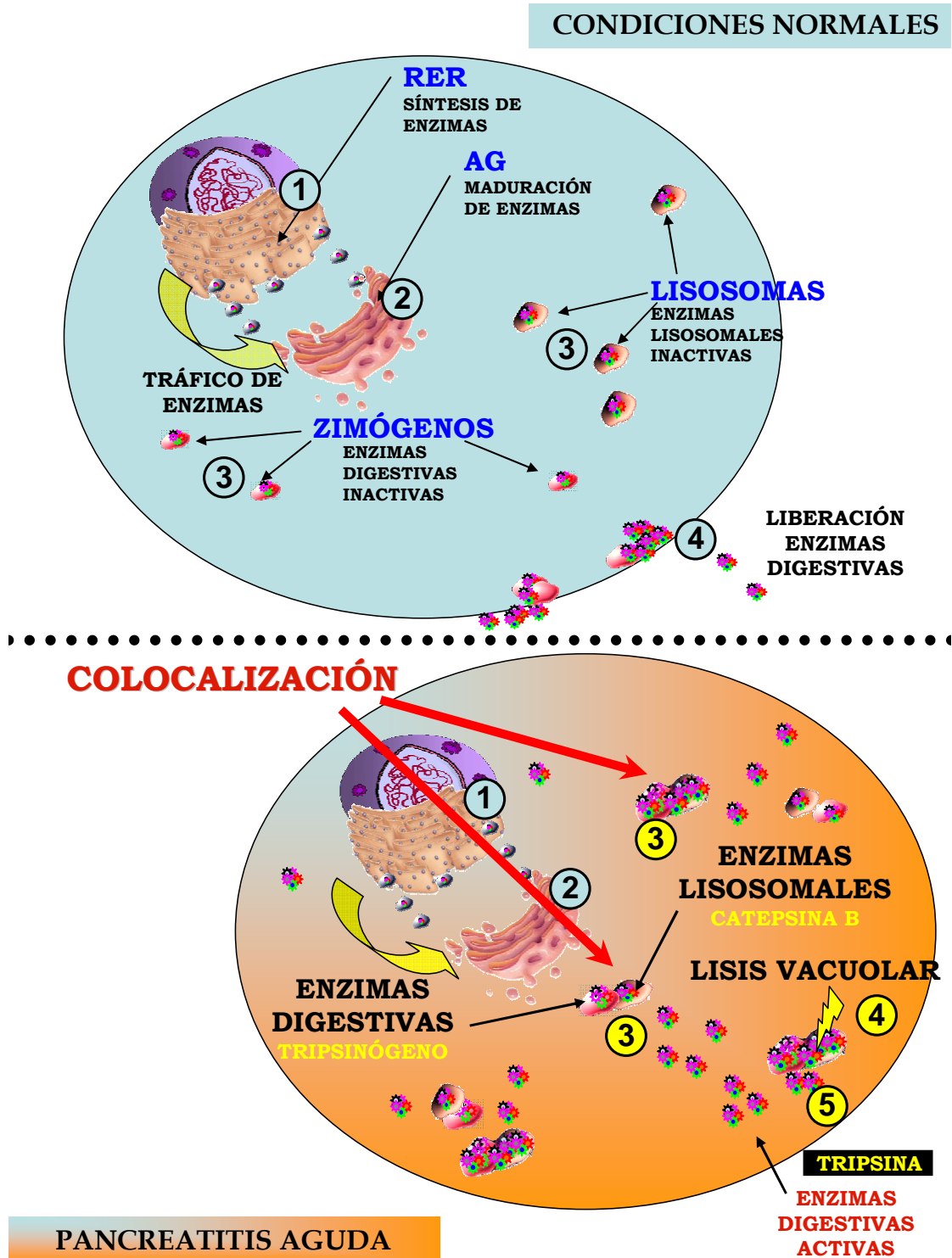
En 1982, el grupo de Steer observó que se producía una colocalización de los gránulos de zimógeno cargados de enzimas digestivas con hidrolasas lisosomales en las fases tempranas de la pancreatitis aguda inducida por etionina (Koike y cols., 1982). La colocalización se produce mediante un proceso de crinofagia que supone la fusión de lisosomas con los gránulos de zimógeno (figura 1). Otros modelos experimentales, tanto por estimulación con ceruleína como por obstrucción del conducto pancreático, mostraron el mismo proceso 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; Van Acker y cols., 2007) y que los ratones knockout de la catepsina B presentan menores niveles de tripsina intrapancreática tras la inducción experimental de la pancreatitis aguda (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.

Otros autores, sin embargo, han cuestionado esta teoría, al observar la posibilidad de conseguir colocalización sin producir pancreatitis aguda (Luthen y cols., 1995). Por otro lado, ni la administración de inhibidores de enzimas lisosomales *in vivo* previene el desarrollo de la pancreatitis aguda, 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). Por tanto, otros mecanismos podrían activar la tripsina durante la PA, como alteraciones del pH, la NADPH oxidasa de los neutrófilos o la autofagia (Gukowskaya y cols., 2002; Hashimoto y cols., 2008).

INTRODUCCIÓN

Figura 2.- Iniciación de la pancreatitis aguda. Teoría de la colocalización en células acinares.



INTRODUCCIÓN

Hoy en día se acepta que la PA no se desencadena solamente por el proceso autodigestivo del páncreas, sino que estos sucesos tempranos desencadenan un daño y la eventual muerte de la célula pancreática, iniciando la activación de los mediadores de la inflamación local. Recientemente se ha demostrado una presencia elevada de marcadores de la activación de proteasas y de inflamación, 24 h después del inicio de la pancreatitis aguda y mientras que los marcadores de la activación de proteasas disminuyen a las 48 h, los marcadores de inflamación perduran durante mayor tiempo (Regnér y cols., 2008).

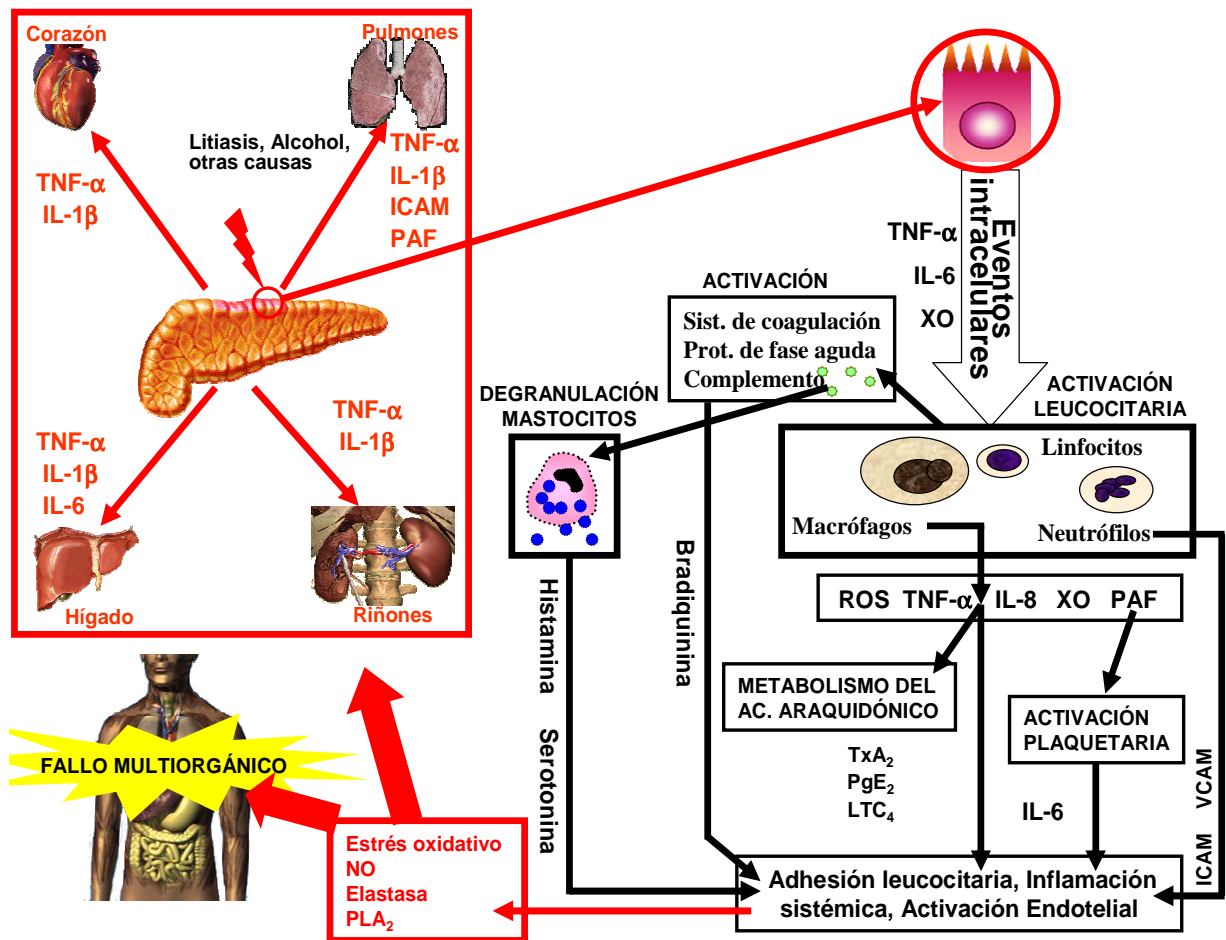
La respuesta inflamatoria del organismo ante una agresión en condiciones normales quedaría confinada al órgano de origen, debido a la acción de inhibidores, agentes anti-inflamatorios y mecanismos de regulación. Sin embargo, en diferentes procesos como politraumatizados o grandes quemados, sepsis y, en especial, en la PA puede producirse un descontrol de esta respuesta inflamatoria local. La expansión de la respuesta inflamatoria a diferentes órganos distantes, a través de mediadores celulares y mediadores moleculares proinflamatorios se denomina síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) (figura 3). El SIRS causa en su evolución un proceso de fallo orgánico, potencialmente reversible, que cuando afecta a dos o más sistemas diferentes del órgano de origen se denomina síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) (figura 3).

El trastorno orgánico más frecuente que puede surgir durante la PA ocurre a nivel pulmonar y se considera la causa más importante de mortalidad inmediata (De Campos., 2007). La gravedad de la PA se ha asociado clínica y experimentalmente a la concentración de fosfolipasa A₂ (PLA₂), aumentando su expresión a las 6 h del inicio de la PA y participando en el desarrollo de la cascada inflamatoria en pulmón (Closa y cols., 1996; Zhang y cols., 2005). Otras complicaciones que pueden darse en la PA son la insuficiencia renal que conduce a una necrosis tubular aguda que produce la muerte en muchos pacientes (Zhang y cols., 2008), o la afectación del sistema digestivo, que puede verse alterado por una translocación bacteriana desde el intestino al páncreas causando complicaciones sépticas (Nakajima y cols., 2007). El hígado puede verse

INTRODUCCIÓN

también afectado y aunque su afectación directa parece ser baja, produce el aumento de la PLA₂ y citoquinas contribuyendo a la afectación pulmonar (Closa y cols., 1996 y 1999).

Figura 3.- Patofisiología de la pancreatitis aguda (SIRS y MODS).



INTRODUCCIÓN

2. MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN.

La inflamación es un mecanismo adaptativo y estrechamente regulado, que constituye la primera línea de defensa del organismo frente a un estímulo tóxico o situaciones de estrés, tales como traumas, infecciones, post-isquemia, tóxicos o autoinmunidad; se produce un flujo de interacciones, entre distintos factores solubles y células, cuyo objetivo último es eliminar del organismo la causa inicial de una lesión y reparar el tejido afectado (Nathan, 2002).

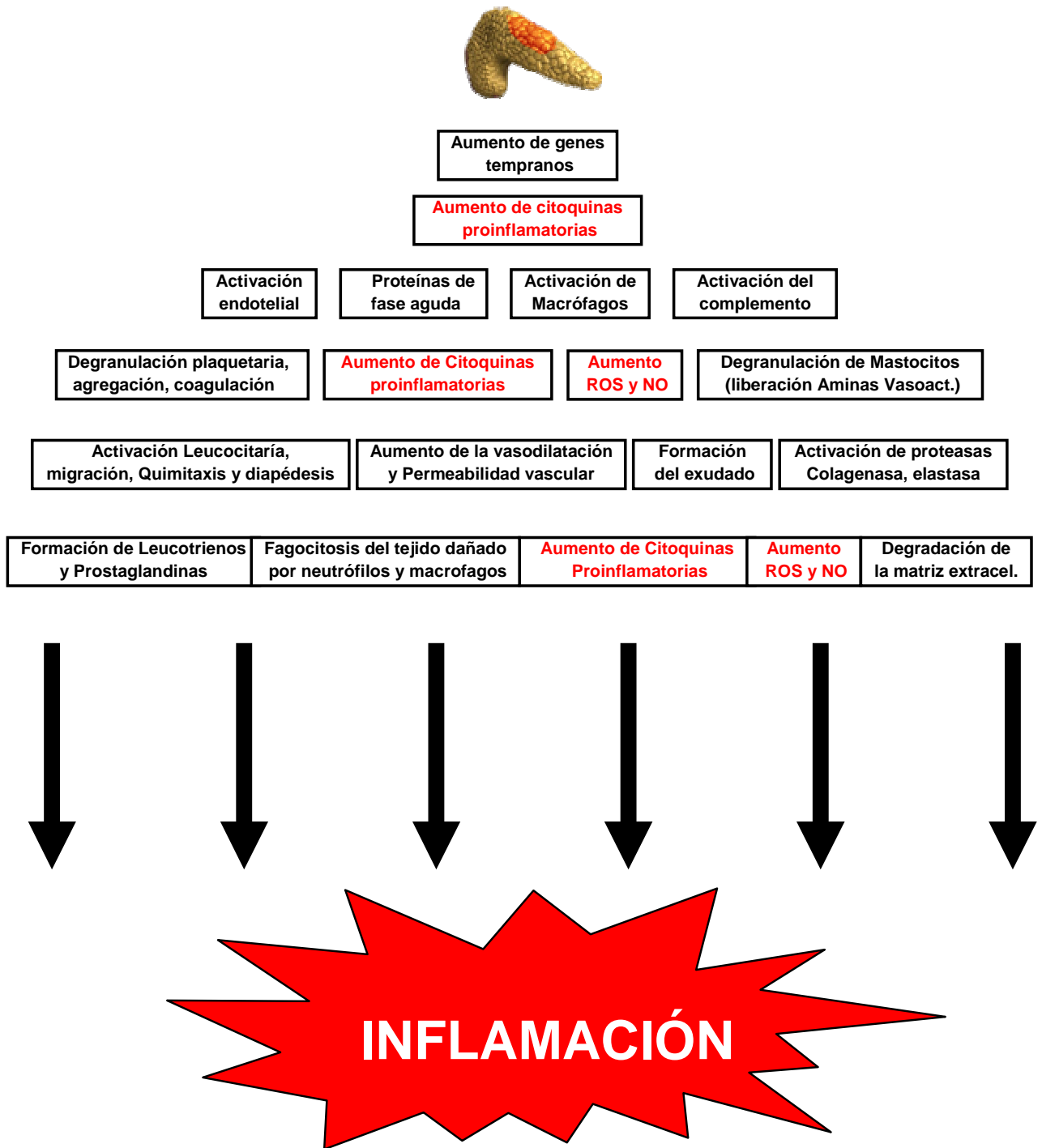
En un principio, la respuesta inflamatoria es beneficiosa y protectora, pero puede convertirse en perjudicial para la salud, bien sea por sufrir alteraciones que la perpetúen a una inflamación crónica, o por descontrolarse produciendo SIRS y en consecuencia MODS (Medzhitov, 2008).

En la inflamación ocurre una regulación muy sofisticada, de tal manera que por ejemplo, cuando lo primero que se produce es el daño de un tejido, el reto del mecanismo es detectar si está acompañado de una infección; por el contrario si se produce una infección comprueba si se ha producido daño tisular. Cuando el daño tisular y la infección coincide, la finalidad es responder lo más rápidamente frente al foco infeccioso, incluso a costa de producir un daño mayor en el tejido. La necesidad del organismo de detectar ambas situaciones a la vez antes de tomar las arriesgadas decisiones de autolesionarse implica una dependencia de un complejo entramado de señalización a distintos niveles organizados en una serie de puntos de control (Nathan, 2002; Medzhitov, 2008).

En toda esta red de comunicación ocurren eventos a nivel tisular, vascular, celular y molecular (figura 4), en la que participan distintas moléculas solubles y difusibles (Tabla 1).

INTRODUCCIÓN

Figura 4.- Fenómenos que acontecen en el proceso inflamatorio debido a una agresión tisular.



INTRODUCCIÓN

Tabla 1.- Moléculas implicadas en el proceso inflamatorio.

EVENTO	MEDIADORES
Activación endotelial y leucocitaria	Citoquinas proinflamatorias.
Producción de reactantes de fase aguda	Citoquinas proinflamatorias.
Quimiotaxis	C5a, LT B ₄ , IL-8, productos bacterianos, sistema de coagulación.
Vasodilatación	PG E ₂ , D ₂ ,F ₂ , I ₂ , NO.
Aumento de la Permeabilidad Vascular	Histamina, serotonina, bradiquinina, kaliceína C3a y C5a, Leucotrienos C ₄ , D ₄ , E ₄ , PAF, Sistema de coagulación, ROS.
Rodamiento leucocitario	Integrinas, selectinas.
Diapédesis	ICAM-I, VCAM-I.
Formación de edema	Histamina e histaminasa.
Daño tisular	Enzimas lisosomales de Neutrófilos y Macrófagos, ROS, NO.
Dolor	Prostaglandinas E ₂ , Bradiquinina.
Fiebre	Prostaglandinas E ₂ , citoquinas proinflamatorias

INTRODUCCIÓN

2.1. Especies reactivas de nitrógeno (RNS) y oxígeno (ROS).

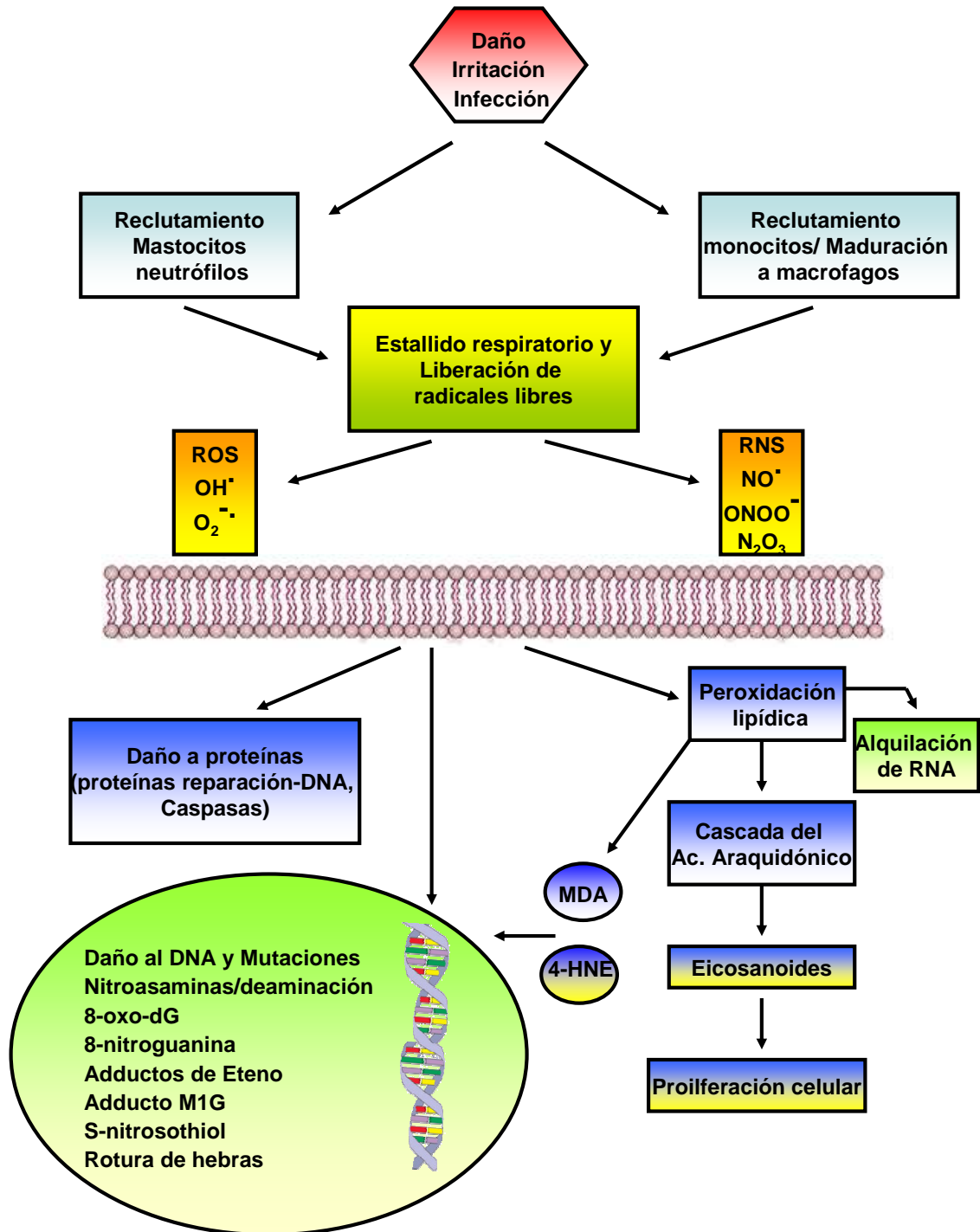
Las ROS y RNS juegan un papel importante en el metabolismo celular. En general, niveles moderados de ROS/RNS pueden actuar como señales para promover la proliferación y supervivencia celular, mientras que un severo incremento de ROS/RNS puede inducir la muerte celular. En condiciones fisiológicas, el equilibrio entre la generación y eliminación de ROS/RNS mantienen el funcionamiento correcto de la señalización proteica redox-sensitiva. Normalmente la homeostasis redox asegura la respuesta celular correcta a distintos estímulos exógenos. Sin embargo, cuando la homeostasis redox es alterada, el estrés oxidativo puede conducir a la muerte celular aberrante y contribuir al desarrollo de la patología (Trachootham y cols., 2008).

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies pro-oxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986), y puede originarse por un exceso de sustancias pro-oxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez, la sobreproducción de RNS se denomina estrés nitrosativo (Ridnour y cols., 2004).

Las ROS y RNS son liberadas por macrófagos, neutrófilos, células endoteliales y tisulares en respuesta a diferentes estímulos, entre otros la PA, participando activamente en el proceso inflamatorio (Hussain y cols., 2003, Chvanov y cols, 2005; Pereda y cols., 2006; Leung y Chan, 2009) (figura 5).

INTRODUCCIÓN

Figura 5.- Papel de las ROS/RNS en la inflamación.



INTRODUCCIÓN

2.2. Sistemas de defensa contra los radicales libres.

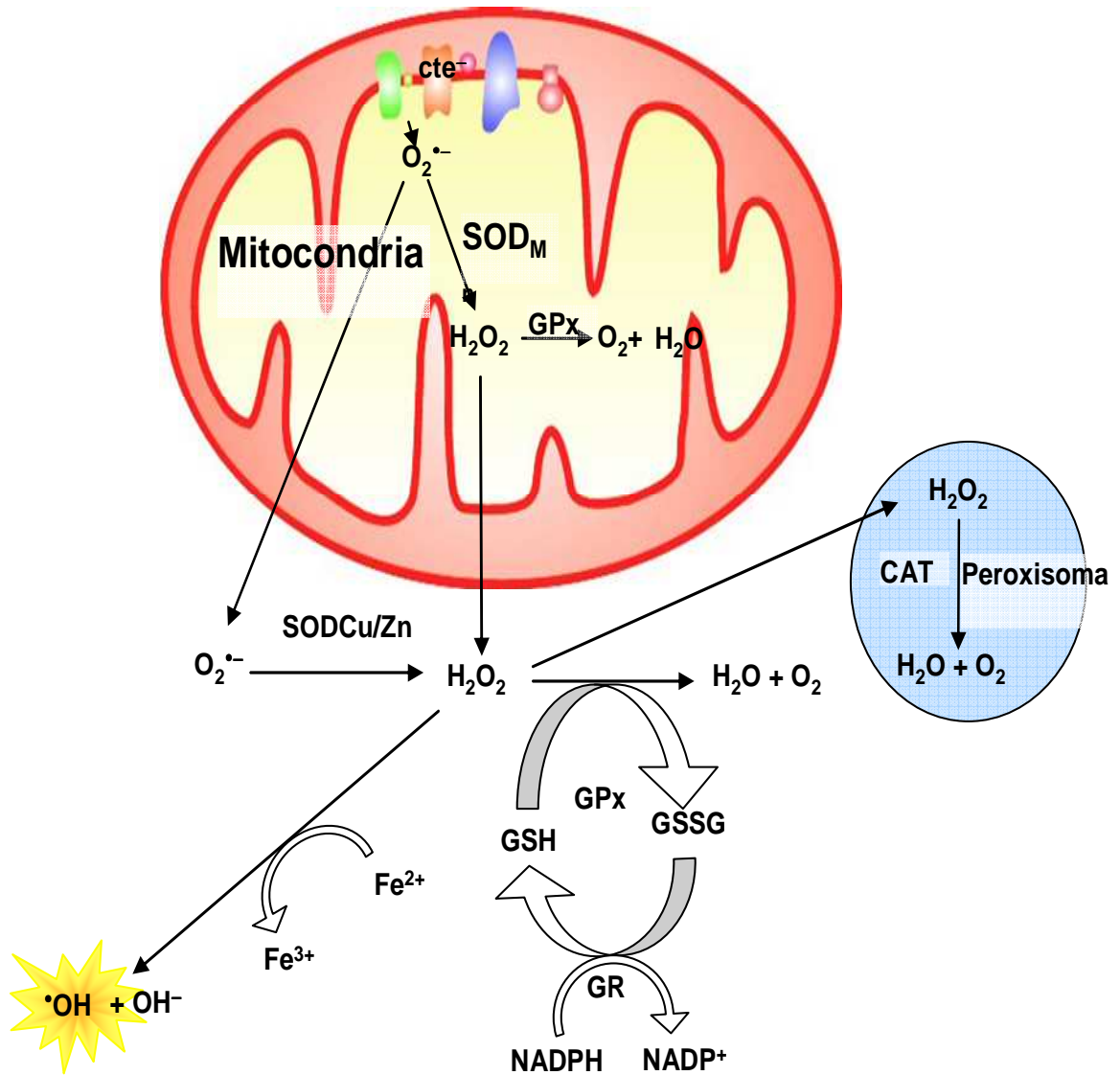
Como la maquinaria celular está produciendo radicales libres continuamente, necesita poseer sistemas de contención de estos prooxidantes. Bajo el punto de vista bioquímico se pueden dividir en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

2.2.1. Sistemas de defensa contra los radicales libres.

La principal defensa contra los radicales libres es llevada a cabo por un sistema enzimático que está constituido fundamentalmente por tres enzimas (figura 6): la familia superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y EC-SOD), la catalasa (CAT), y la familia glutatión peroxidasa (GPx selenio dependiente y GPx selenio independiente) (Yu, 1994). En ausencia de estrés oxidativo, las ROS que se generan se mantienen a niveles muy bajos gracias a la acción coordinada de estas tres enzimas. Tanto un descenso en la capacidad antioxidante, como la sobreexpresión unilateral de una de estas tres enzimas, puede aumentar la vulnerabilidad de la célula a los radicales libres (Dreher y Junod, 1996).

INTRODUCCIÓN

Figura 6.- Defensa antioxidante enzimática (SOD, GPx y CAT).



INTRODUCCIÓN

2.2.2. Defensa antioxidante no enzimática. Papel antioxidante del glutatión (GSH).

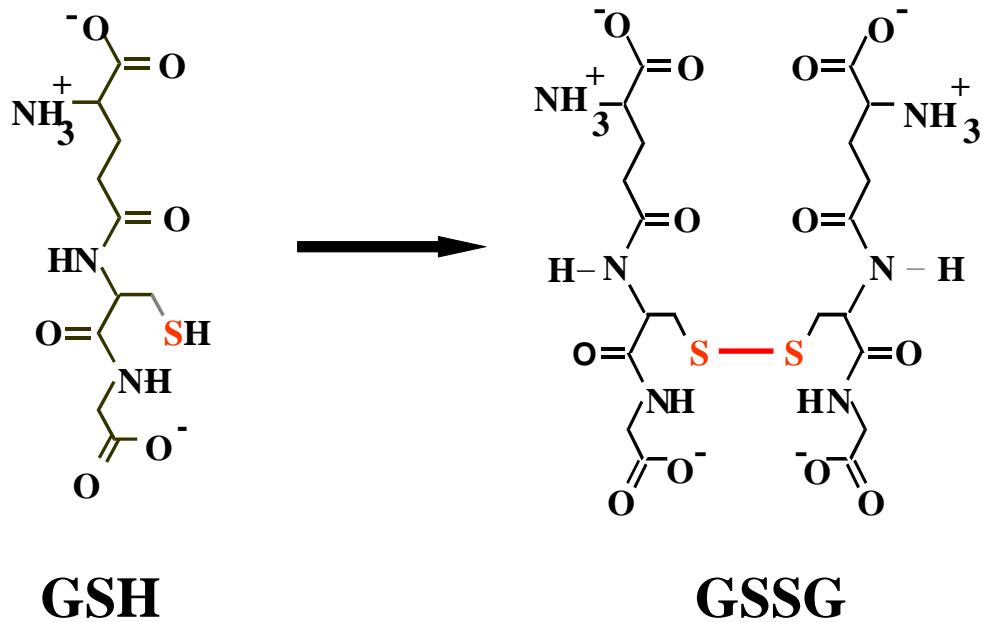
Los antioxidantes no enzimáticos constituyen la primera línea defensiva frente a los radicales libres tanto extracelulares como intracelulares. Estos antioxidantes pueden ser moléculas lipófilas como los estrógenos, la bilirrubina, los flavonoides y los carotenoides o hidrófilas como el GSH o el ácido úrico. Otras moléculas con carácter antioxidante son la melatonina, la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina D (α -tocopherol) y sus derivados.

Dentro de las defensas no enzimáticas, tienen un papel importante los tioles no proteicos, de los que el glutatión o GSH (L- γ -glutamil cisteinil glicina) es el más abundante en las células de mamífero.

Este tripéptido puede aparecer, según su estado redox, en forma de GSH o de glutatión oxidado, GSSG, por unión de dos moléculas de GSH mediante un puente disulfuro entre las cisteínas (figura 7). El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas, como detoxificar los ROS/RNS en las células o proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones (Sies, 1991). El GSH también interviene en la síntesis de ADN (Estrela y cols., 2006) y en la captación de aminoácidos en algunos tejidos (Viña y cols., 1989), modula actividades enzimáticas (Pajares y cols., 1992), regula la homeostasis del calcio (Bellomo y cols., 1982), la proliferación celular (Terradez y cols., 1993) y es un reservorio de cisteína (Tateishi y cols., 1974). Muchas de estas funciones se deben a su peculiar estructura química. El grupo tiol (-SH) de la cisteína es el que interviene en las reacciones redox, mientras que el enlace γ -glutamilo entre el glutámico y la cisteína le hace resistente a la degradación por la mayoría de peptidasas celulares.

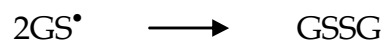
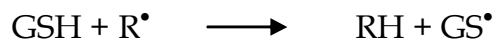
INTRODUCCIÓN

Figura 7.- Estructura del glutatión reducido y oxidado.

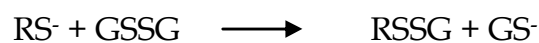


El GSH puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutatión peroxidasa, o bien reaccionar directamente con los ROS/RNS sin intervención enzimática alguna, intercambiando electrones a través del azufre de la cisteína que contiene en su estructura. Así, puede actuar de las siguientes formas:

1. Reacción directa con un radical libre.

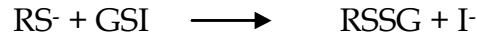


2. Intercambio tiol - disulfuro.



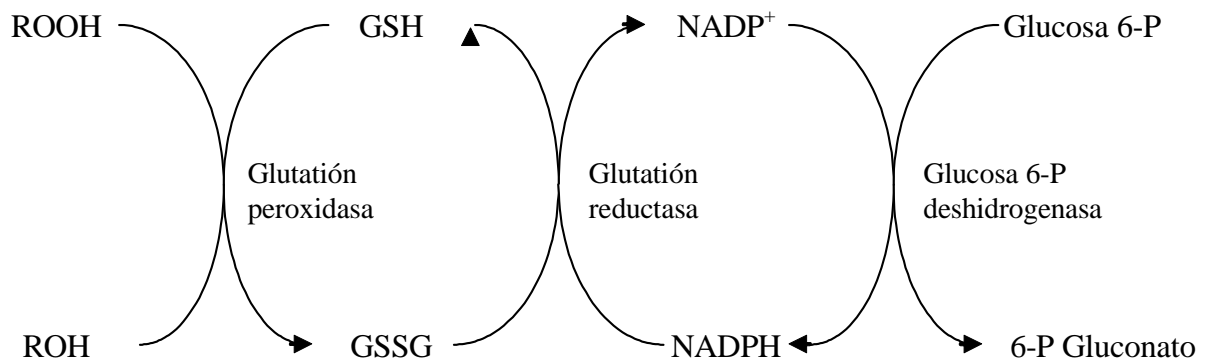
INTRODUCCIÓN

3. Oxidación dieléctrica.



El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio de la enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, GAPDH (figura 8). Tanto la glutatión peroxidasa como la glutatión reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad mitocondrial.

Figura 8.- Ciclo redox del glutatión.



2.2.3. Síntesis del GSH. Papel de la glutamato cisteína ligasa.

En situaciones fisiológicas, los factores limitantes para la síntesis de GSH son la disponibilidad de cisteína (Tateishi y cols., 1977; Tateishi y cols., 1974) y la actividad de la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL), también denominada γ -glutamilcisteína sintetasa (GCS) (Díaz y cols., 2002). La GCL da lugar a la γ -glutamilcisteína a partir de L-glutámico y L-

INTRODUCCIÓN

cisteína (figura 9, reacción 1) y su actividad de síntesis del GSH está regulada por retroalimentación negativa, ya que el propio GSH inhibe la GCL (Richman y Meister, 1975). El segundo paso de la síntesis de GSH (figura 9, reacción 2) está catalizado por la GSH sintetasa, que une una glicina a la γ -glutamil cisteína. El GSH sintetizado intracelularmente es transportado al exterior celular (figura 9, reacción 3).

2.2.4. Degradación del GSH. Papel de la γ -glutamil transpeptidasa (γ GT). Ciclo del γ -glutamilo.

Tras su síntesis, el GSH puede ser utilizado o degradado. La catabolización del GSH se realiza en parte dentro de la célula y en parte fuera de la misma. El GSH se exporta fuera de la célula por medio de un transportador específico. Comienza entonces la acción de la γ -glutamil transpeptidasa, γ -GT, que cataliza dos tipos de reacciones (figura 9, reacción 4):

- 1) Reacción de transpeptidación: en la que el γ -glutamilo se transfiere a un aceptor.
- 2) Hidrólisis del enlace γ -glutamilo.

La actividad γ -GT se localiza en la membrana plasmática de las células (Meister y Anderson, 1983) con su *locus* activo se orientándose al exterior celular. Cuando el GSH interacciona con la cara externa de la membrana, la γ -GT forma γ -glutamil aminoácido, que entra al interior de la célula. La enzima γ -glutamil ciclotransferasa cataliza la liberación del aminoácido y la síntesis de L-5-oxo-prolina (figura 9, reacción 5). La oxoprolinasa cataliza la hidrólisis dependiente de ATP de la oxoprolina (figura 9, reacción 6), lo cual libera glutamato para la síntesis de GSH.

INTRODUCCIÓN

Una dipeptidasa hidroliza la cisteinilglicina formada por la γ -GT (figura 9, reacción 7). Por tanto, la actividad de la γ -GT se convierte en una fuente de los aminoácidos precursores del GSH y su abundancia favorece la formación de la γ -glutamil cisteína (Leung y Chan, 2009).

Existen diferentes mecanismos para el transporte de la cisteína y de equivalentes de cisteína al interior celular. El sistema ASC, mediante un transporte sodio dependiente, introduce cisteína extracelular (Knickelbein y cols., 1997) (figura 9, reacción 8).

El conjunto de reacciones que participan en la síntesis y degradación del GSH constituye el llamado ciclo del γ -glutamilo y fue postulado por Meister y Anderson (Meister y Anderson, 1983: figura 9).

2.2.5. Conjugación del GSH a proteínas. Papel de las glutatión-S- transferasas (GSTs) y de la glutarredoxina (GTx).

También son sustrato de la γ -GT los GSH-conjugados producidos por la reacción catalizada por las glutatión S-transferasas, GSTs (figura 9, reacción 9). Esta familia enzimática cataliza las reacciones entre GSH y una amplia variedad de compuestos electrofílicos de origen exógeno, dando lugar a dichos GSH-conjugados (en la figura 9, el GSH y los GSH-conjugados son representados conjuntamente como γ -Glu-Cys(X)-Gly).

Las GSTs forman el mayor grupo de enzimas detoxificadores y todas las células eucariotas poseen múltiples isoenzimas tanto citosólicas como de membrana (Unlü y cols., 2008). Las enzimas citosólicas están presentes en el páncreas y están codificadas por al menos 5 familias génicas distintas: GSTs *alpha* y *mu*, localizadas principalmente en el sistema ductal y en el lumen del páncreas exocrino y las GST *theta*, *pi* y *sigma*, localizadas en las células acinares pancreáticas (Leung y Chan, 2009). Las enzimas de membrana están representadas por la GST microsomal y la leucotrieno C4 sintetasa, ambas codificadas por un único gen (Hayes y Pulford, 1995). La isoforma GST omega fue descubierta por

INTRODUCCIÓN

análisis bioinformático (Whitbread y cols., 2005) y aún se están encontrando nuevas GSTs como la isoforma recientemente descubierta en diatomeas (Hervé y cols., 2008). Existen numerosas evidencias del papel crucial que representan estas enzimas en la sensibilidad celular a un amplio espectro de tóxicos (Kato y cols., 2008) y participan en procesos metabólicos como la respuesta al estrés, la proliferación celular y la apoptosis, y en procesos oncogénicos como la progresión y la resistencia a fármacos de las células tumorales (Lo y cols., 2007).

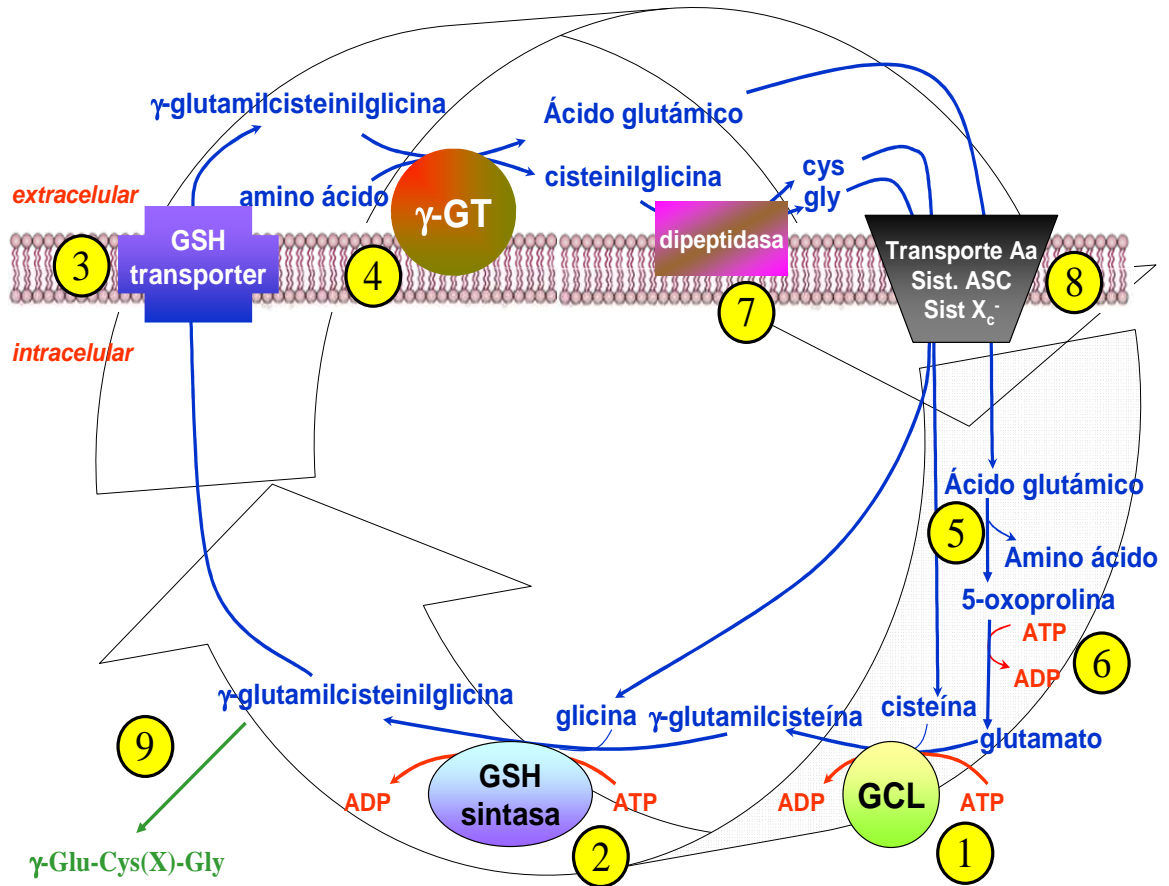
Por otro lado, la glutarredoxina (GTx) también participa en el control redox de la células mediando la glutationilación de proteínas, como la ribonucleasa pancreática, que presenta ocho grupos tiólicos y su forma más activa es la transición oxidada, ribonucleasa-(S₂)₄ (Lundström – Ljung y Holmgren, 1995).

La GTx, junto con la tiorredoxina (TRx) son enzimas antioxidantes que en mamíferos forman parte de los sistemas “NADPH/GSSG reductasa/GSH/GTx” y “NADPH/TRx reductasa/TRx” respectivamente y su actividad es muy importante en el desarrollo de muchas patologías como enfermedades vasculares (Berndt y cols., 2007) o el Alzheimer (Akterin y cols., 2006). El estado redox celular modula la transcripción génica, vías metabólicas y vías de señalización (Holmgren y cols., 2005). Por ejemplo, el GSSG en el retículo endoplasmático es vital inactivando proteínas nacientes y otras proteínas reducidas, controlando su activación a través de la formación de puentes disulfuros (Lundström-Lung y Holmgren, 1995). El sistema NADPH/GSSG reductasa/GSH/GTx, además participa en otros procesos como proteger a las células de la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno (Wang y cols., 2007).

La GTx también ha sido relacionada con el desarrollo de la inflamación en diferentes patologías (Shelton y cols., 2008).

INTRODUCCIÓN

Figura 9.- Ciclo del γ -glutamilo (Meister y Anderson, 1983).



- | | |
|--|--|
| 1.- γ -glutamil-cisteína ligasa. | 6.- Oxprolinasa. |
| 2.- Glutatió sintetasa. | 7.- Dipeptidasa. |
| 3.- Salida de GSH. | 8.- Sistema ASC y Sistema X _c . |
| 4.- γ -glutamil transpeptidasa. | 9.- Glutatió-S-transferasa. |
| 5.- γ -glutamil ciclotransferasa. | |

INTRODUCCIÓN

2.2.6. Papel de la defensa antioxidante en la pancreatitis aguda.

El mayor detoxificador celular de las ROS es el GSH. La concentración tisular de GSH está comprendida entre 0,5 y 10 mM, siendo la concentración del GSH extracelular del orden micromolar. La adecuada biodisponibilidad del GSH depende de la sofisticada cooperación entre la GSH reductasa y la GCL, manteniendo un cociente GSH/GSSG entre 30:1 y 100:1, suficiente para luchar contra estímulos oxidativos.

El páncreas aparece evolutivamente preparado para la defensa contra el estrés oxidativo. La concentración de GSH en el páncreas es de 2 $\mu\text{mol/g}$ tejido, siendo uno de los tejidos con mayor cantidad de GSH. En el páncreas también aparecen otros antioxidantes como la vitamina C, la vitamina E y la vitamina A en cantidades considerables (Leung y Chan, 2009).

El páncreas exocrino presenta una actividad relativamente baja de la GCL, a pesar de lo cual es capaz de sintetizar GSH. En compensación, el páncreas presenta una actividad γ -GT elevada y la vía de transulfuración se mantiene intacta en los acinos pancreáticos, lo que favorece la activación de la síntesis de GSH a partir de sus aminoácidos (Leung y Chan, 2009). La abundancia de los aminoácidos precursores favorece la formación de GSH a pesar de la baja actividad de la GCL.

La asociación entre los antioxidantes y la inflamación pancreática ha sido extensamente estudiada durante la última década. La disminución de expresión y la pérdida de actividad de las enzimas antioxidantes pueden exacerbar el proceso oxidativo. Está bien documentado que en diferentes modelos de pancreatitis aguda y crónica disminuyen la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) produciéndose un desequilibrio redox. Además las actividades GPx y tiorredoxina (TRx) están consideradas marcadoras de severidad de pancreatitis aguda (Leung y Chan, 2009).

En cuanto al GSH, se convierte en un factor crítico en el transcurso de la pancreatitis aguda. Durante la pancreatitis aguda se produce una

INTRODUCCIÓN

disminución de los niveles de GSH y el mantenimiento de esos bajos niveles de GSH podría ser responsable de la transformación de una pancreatitis aguda leve en una grave (Rahman y cols., 2004).

No obstante, el fallo en la inducción de la síntesis de GSH no es ni el primer, ni el único evento que participa en el descenso de los niveles de GSH. Por ejemplo, también aparecen involucradas GSTs. Hay numerosas evidencias que relacionan la severidad de la pancreatitis aguda con un aumento en la actividad GST (Leung y Chan, 2009). La paradoja se da porque la actividad de estas enzimas detoxificadoras, que en principio se esperaría que actuaran en contra del estrés oxidativo, pueden agravar la patología de la pancreatitis aguda. Este suceso podría deberse a procesos de conjugación del GSH con distintos xenobióticos que posteriormente son excretados de la célula favoreciendo la disminución del GSH intracelular (Baron y cols., 1986) e interrumpiendo el ciclo normal del GSH producido por el sistema GPx/GSH reductasa (Olson y Hallahan, 2004).

En definitiva, durante la pancreatitis aguda ocurren distintos procesos que disminuyen los niveles de GSH, y el mantenimiento de los niveles de GSH deplecionados podría contribuir al agravamiento de la dolencia.

2.3. Citoquinas.

En la inflamación, a través de la transducción de señales, se produce la actuación de factores de transcripción que hacen que se liberen citoquinas. Las citoquinas son proteínas liberadas principalmente por células del sistema inmunológico que actúan como señales intercelulares no específicas, mediante las cuales, determinadas células pueden atraer a otras y activarlas propagando y amplificando la respuesta inflamatoria (Medzhitov, 2008; Gullberg, 2008).

Se forman *de novo* ante un estímulo, su secreción es breve y limitada y suelen actuar localmente o en la vecindad de las células del

INTRODUCCIÓN

interior de un tejido. Su síntesis se activa por 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 también están reguladas por proteínas supresoras de la señal citoquinica (SOCS), que inhiben las vías de transducción de las citoquinas. Las SOCS son inducidas por las propias citoquinas (retroalimentación negativa), o por otros mediadores como lipopolisacárido (LPS), isoproterenol, estatinas y AMPc (Yoshimura y cols., 2007).

El desequilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y las antiinflamatorias se ha implicado en el desencadenamiento y evolución de numerosas patologías, entre ellas la pancreatitis aguda, en la que los macrófagos activados liberan citoquinas proinflamatorias, en respuesta al daño local pancreático (Viterbo y cols, 2008) y sistémico (Naskalski y cols., 2007).

2.3.1. Citoquinas proinflamatorias.

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

El TNF- α es un polipéptido con efectos pleiotrópicos que se produce a partir de un precursor de 26 KDa unido a la membrana. La acción catalítica de la enzima convertidora de TNF- α , ECTA, libera la forma soluble de 17 KDa que es capaz de activar receptores específicos del TNF- α (figura 10). Una vez liberado de la membrana se agrega formando complejos de tres moléculas que se unen y activan los receptores. El TNF- α de membrana también es activo y parece que es el principal ligando del receptor de tipo 2. El TNF- α es capaz de inducir su propia síntesis, y la de otras citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión (Papachristou, 2008). También es transductor de señal de muerte celular a través de la

INTRODUCCIÓN

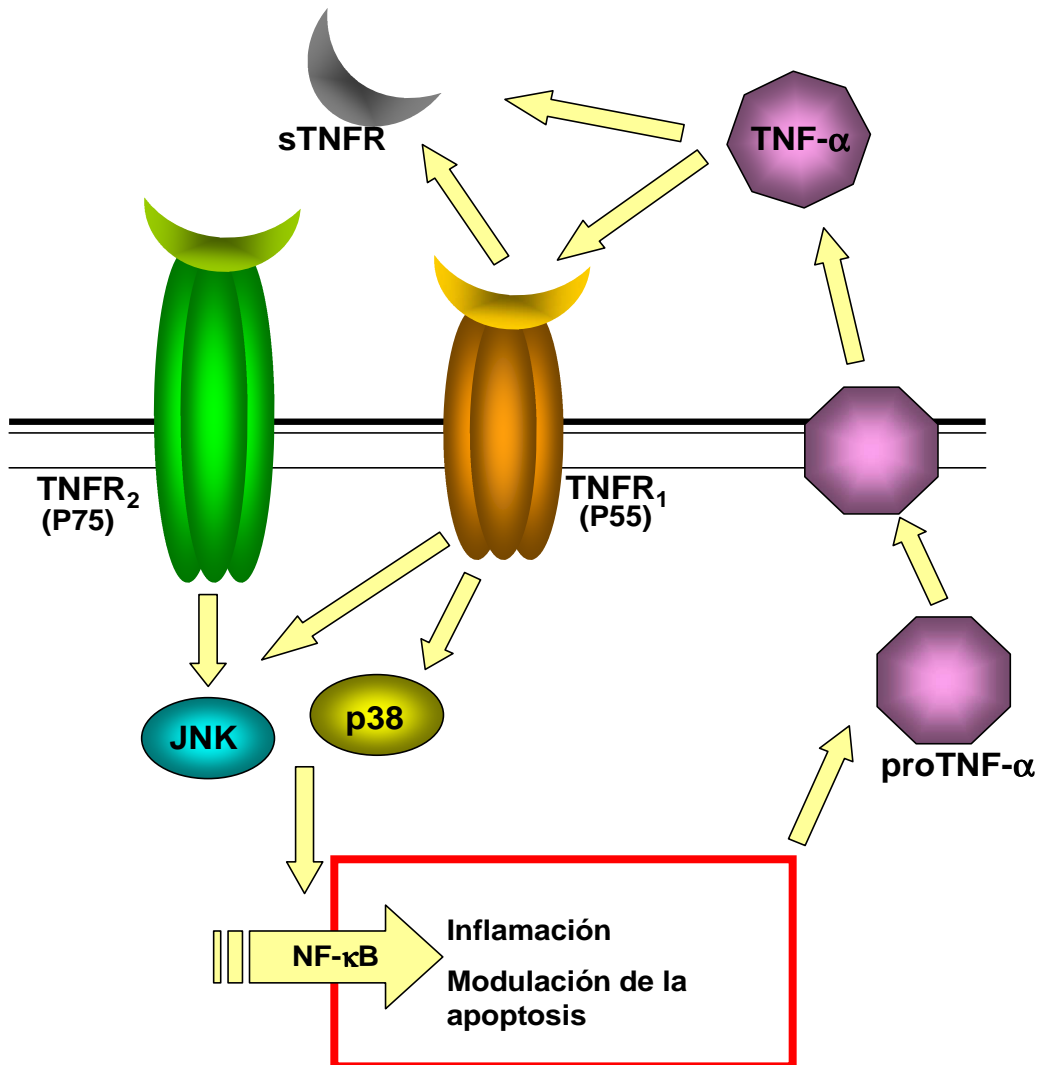
vía de su ligando receptor (TRAIL) con potencial de causar daños tisulares severos.

Las células que mayor cantidad de TNF- α sintetizan son los monocitos y los macrófagos, aunque también lo producen otros tipos celulares entre los que se encuentran las células acinares. El principal estímulo para su producción es el lipopolisacárido (LPS), pero su producción se ve aumentada también en respuesta a bacterias, virus, citoquinas (IL-1, IL-2 o GM-CSF), complejo mayor de histocompatibilidad, radiación X, cristales de urato, factor C5a del complemento y ROS (Mühl y Pfeilschifter, 2003). La regulación post-transcripcional del ARNm del TNF- α es muy compleja y en ella intervienen las MAP quinasas (Deleault y cols., 2008).

El TNF- α también juega un papel clave en la PA severa, actuando tempranamente en su evolución. Como resultado de su rápida eliminación, los niveles séricos de TNF- α son peores indicadores del desarrollo de la inflamación que otras citoquinas como IL-6 (Papachristou, 2008). Para limitar sus efectos a nivel sistémico, el cuerpo libera inhibidores de TNF- α . El receptor soluble de TNF- α (sTNFR) atenúa el efecto del TNF- α uniéndose a él en el suero y actuando así como molécula anti-inflamatoria. Los niveles de TNFR han resultado ser marcadores de la severidad de la PA con una fiabilidad del 96% (Malleo y cols., 2007).

INTRODUCCIÓN

Figura 10.- Receptores de TNF- α y mecanismo de acción intracelular.



- Interleuquina 1 (IL-1).

La interleuquina IL-1 es una potente citoquina proinflamatoria. Como el TNF- α , se sintetiza fundamentalmente en los macrófagos activados

INTRODUCCIÓN

aunque también en células epiteliales y endoteliales (Gosselin y Rivest, 2007). 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 (O'Connor, 2008).

La IL-1 ha sido probada como marcador de severidad en la PA grave obteniéndose una fiabilidad similar a la IL-6 (81% *vs.* 88%) (Malleo y cols., 2007).

- **Interleuquina 6 (IL-6).**

La IL-6 se produce por numerosas células como son los macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células musculares lisas (Montero-Julian, 2001). 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 pirexia. La IL-6 se sintetiza en respuesta al estímulo del TNF- α , de la IL-1 y de la endotoxina. 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

INTRODUCCIÓN

días más tarde (con un máximo a las 4-6 h). La IL-6 es el inductor primario de la respuesta proteica de fase aguda (Papachristou, 2008).

- **Interleuquina 8 (IL-8).**

La IL-8 pertenece a una familia de citoquinas pequeñas de 8 a 10 KDa, denominadas quimoquinas, 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 (Wessely-Szponder, 2008). Sin embargo, administrada a los animales no provoca un estado de shock como el TNF- α o la IL-1 β .

- **Interleuquina 10 (IL-10).**

La IL-10 es otra citoquina anti-inflamatoria sintetizada por los linfocitos TH2, 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. Estimula también la producción del antagonista del receptor de IL-1 y la liberación de TNFR2 (Commins y cols, 2008).

- **Proteína asociada a la pancreatitis (PAP).**

La PAP es una proteína de secreción de 16 KDa que fue descubierta en el jugo pancreático de ratas con pancreatitis aguda (Keim y cols., 1984). Estructuralmente está relacionada con la familia de las lecitinas calcio dependientes (tipo C), aunque no se ha descrito ningún trabajo en el que

INTRODUCCIÓN

se comporte como tal. La PAP parece estar involucrada en procesos como la homeostasis del jugo pancreático (Multigner y cols., 1985), o actuando como agente endógeno antibacteriano con un papel protector previniendo complicaciones infecciosas (Iovanna y cols., 1991). También se ha descrito que confiere resistencia a la apoptosis producida por TNF- α [Malka y cols., 2000) o por bajas dosis de H₂O₂ (Ortiz y cols., 1998).

Más recientemente, ha sido descrita como factor anti-inflamatorio *in vitro* (Folch-Puy y cols., 2006) e *in vivo* (Gironella y cols., 2005). Su expresión puede estar inducida por varias citoquinas y por ella misma. El efecto inhibitorio en la vía proinflamatoria de NF κ B parece ser dependiente de la síntesis proteica, igual que con las citoquinas IL-10 e IL-6 (Closa y cols., 2007).

3. PROTEASAS Y MUERTE CELULAR.

Las proteasas o peptidasas son enzimas esenciales para la vida, que conducen al catabolismo de las proteínas por hidrólisis de los polipéptidos y péptidos en los aminoácidos que los forman.

La función de estas proteasas no es meramente destructiva; juegan un papel regulador en muchos procesos biológicos como la fecundación, maduración, envejecimiento y muerte de los organismos, y fisiológicos como la cascada de la coagulación o la apoptosis entre otros. Las proteasas modulan la síntesis y la función de las proteínas, y controlan su composición aminoacídica, tamaño, forma, recambio (*turnover*) y por último su destrucción (Puente y cols., 2003).

Las proteasas son también esenciales en virus, bacterias y parásitos para su replicación y para la transmisión de enfermedades infecciosas.

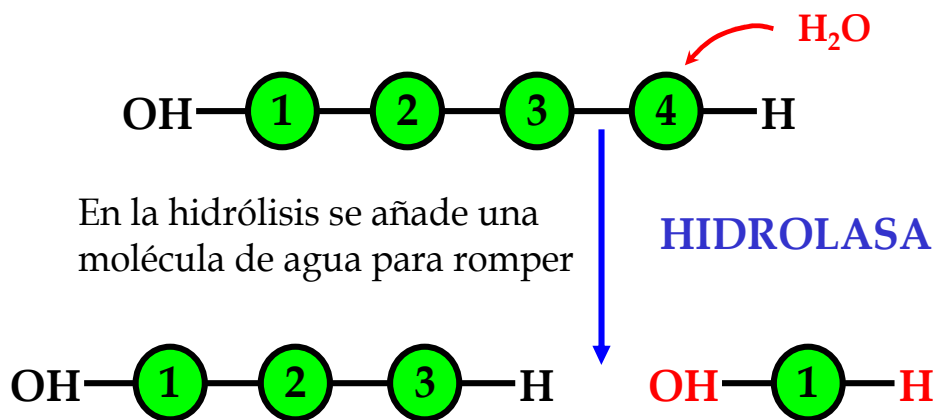
Se conocen más de 600 proteasas humanas cuyos genes ocupan un 2% del genoma humano (Rawlings y cols., 2008) y de forma similar ocurre en todos los organismos. Las proteasas son glicoproteínas

INTRODUCCIÓN

sintetizadas en los ribosomas adosados a la membrana del retículo endoplasmático que sufren la glicosilación en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi y de allí irán a diferentes destinos (López-Otín y Bond 2008), como algunas dipeptidasas que irán al citoplasma ó las caspasas que se sitúan en la mitocondria, citoplasma y núcleo celular, o como la mayoría de ellas que van a parar finalmente a los lisosomas (Puente y cols., 2003).

Las peptidasas son catalogadas como hidrolasas. Las hidrolasas (figura 10) necesitan una molécula de agua para hidrolizar enlaces. Dentro de las hidrolasas, existen las estererasas que rompen los enlaces éster (figura 11), fosfatasas que rompen los enlaces ésteres del fosfato (figura 12) y las peptidasas (figura 13) que rompen los enlaces peptídicos (Gonzalez-Noriega y cols., 1980). Muchas proteasas, entre las cuales están las lisosomales, actúan a pH ácido, una de las características del interior de los lisosomas y del estómago (Just, 1974). Estas proteasas degradan las proteínas provenientes de la digestión en el interior de los lisosomas, en los cuales entran por endocitosis o pinocitosis después de haber sido marcadas con una manosa-6-fosfato. La membrana lisosomal protege a la célula de la acción indiscriminada de estas proteasas.

Figura 11.- Acción de las hidrolasas.



INTRODUCCIÓN

Figura 12.- Hidrólisis producida por las esterasas.

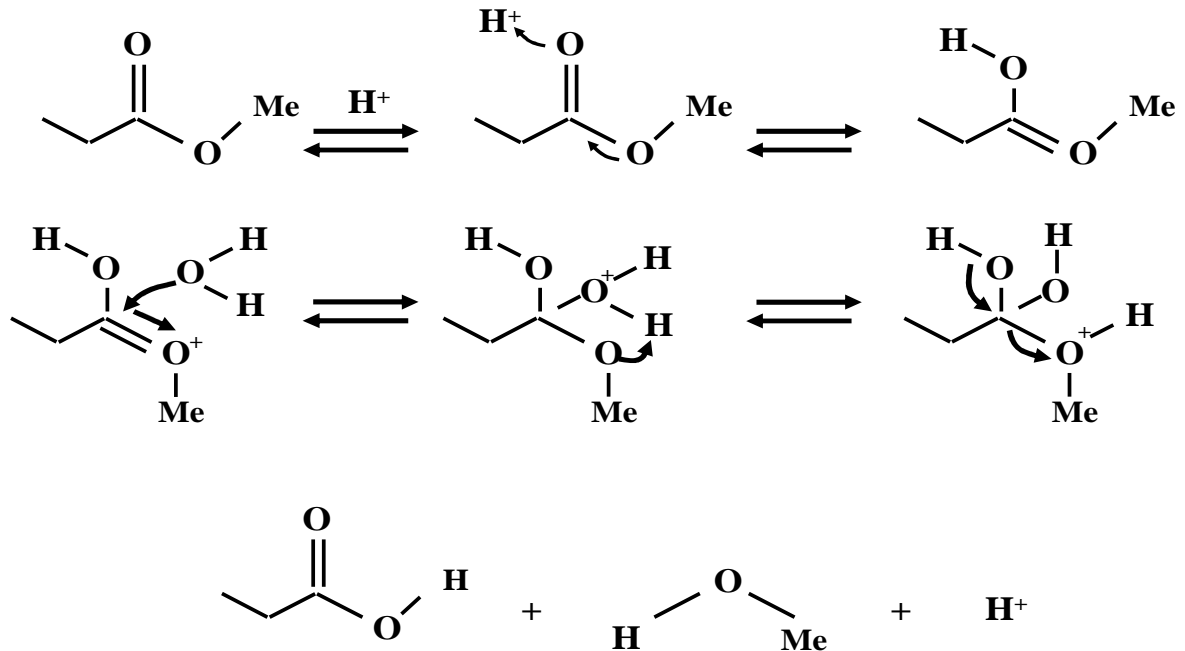
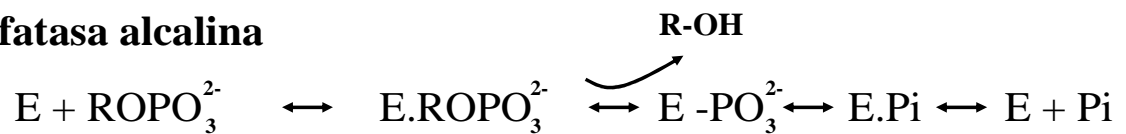
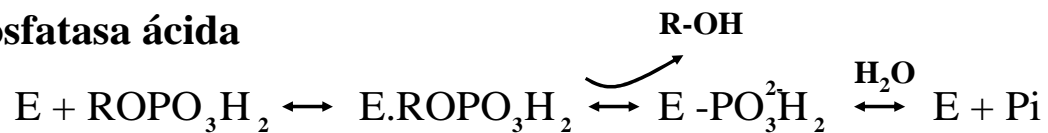


Figura 13.- Hidrólisis producida por las fosfatasa.

Fosfatasa alcalina

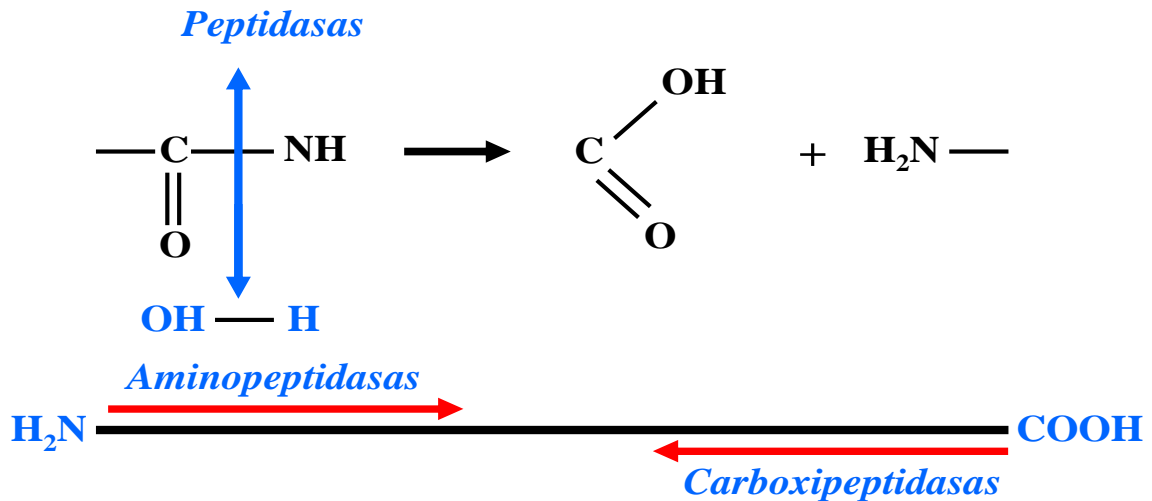


Fosfatasa ácida



INTRODUCCIÓN

Figura 14.- Hidrólisis producida por las peptidasas.



3.1. Tipos de proteasas.

Las proteasas se dividen en endopeptidasas, como la tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína o elastasa y exopeptidasas, como las aminopeptidasas o las carboxipeptidasas. Su diferencia estriba en su actuación sobre las proteínas: las endopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos internos de la secuencia peptídica, mientras que las exopeptidasas son capaces sólo de romper los enlaces peptídicos de los extremos de la secuencia peptídica. La distinción no es absoluta, ya que muchas enzimas pueden tener ambos tipos de actividad. Por acuerdo internacional, las enzimas que presentan actividad endopeptidasa son clasificadas como tales, aunque también presenten actividad exopeptidasa, como por ejemplo la catepsina B (Kirsche y Barret, 1987). La hidrólisis de las proteínas presumiblemente es iniciada por las endopeptidasas que tienen un radio limitado de acción, y el proceso es continuado por las

INTRODUCCIÓN

exopeptidasas, que son extremadamente eficientes incluso en la destrucción de péptidos grandes. Algunos dipéptidos pueden difundirse a través de la membrana lisosomal para ser finalmente degradados por una dipeptidasa en otros compartimentos de la célula (Kirsche y Barret, 1987).

Las peptidasas se clasifican según el carácter de su centro activo y condiciones de acción en 5 grandes grupos. Dentro de cada grupo, las peptidasas se organizan en “clanes” donde se agrupan las que se han originado de un mismo ancestro común.

Dentro de los clanes se agrupan las familias, que son grupos de peptidasas homólogas. La homología se basa en similitudes significativas de las secuencias de aminoácidos (Rawlings y cols., 2008).

- **Aspartil peptidasas.**

Las aspartil peptidasas son un clan de enzimas proteolíticas de la familia de la pepsina que comparten el mismo sistema catalítico y que normalmente funcionan en condiciones ácidas. Este último aspecto limita su funcionamiento a ciertas localizaciones específicas y por eso es menos habitual que otros grupos. Sin embargo, las aspartil peptidasas están presentes en un amplio rango de organismos que varían desde vertebrados a retrovirus y bacterias (Puente y cols., 2003).

La gran mayoría de estas proteasas pertenecen a la familia de la pepsina, presentes sólo en eucariotas (Rawlings y cols., 2008). Su papel fisiológico en la digestión está bastante definido, están presentes en los lisosomas, son secretadas al estómago para hacer la digestión (Roberts, 2006) y su acción sobre las proteínas es inespecífica. Existe una familia muy similar formada por retropepsinas virales (Rawlings y Barret, 1993).

La catepsina D es otra proteína que se encuentra en los lisosomas de la mayoría de las células (Saftig y cols., 1995). Presenta dos centros activos en su estructura para realizar su función habitual en la digestión de proteínas en sincronización con otras catepsinas. La catepsina D puede que juegue un papel clave en la activación de proteínas en compartimentos

INTRODUCCIÓN

prelisosomales. Por ejemplo, ha sido propuesto su papel en el procesamiento de antígenos (Mizuochi y cols., 1994), proliferación celular, regeneración de tejidos (Saftig y cols., 1995) y activación de prohormonas (Authier, 1995). Además, la catepsina D está implicada en procesos degenerativos cerebrales (Cataldo, 1995), patologías del tejido conectivo (Keyszer y cols., 1995) y sobre todo, en la progresión del cáncer y las metástasis (García y cols., 1996).

La catepsina E es otra aspartil proteasa que no es ni secretora ni lisosomal, sino que se sitúa en la red de los compartimentos del retículo endoplasmático y trans-Golgi (Kageyama, 1998), en el endosoma y en la membrana celular (Sastradipura, 1994). La catepsina E está presente principalmente en células del sistema inmunitario y tiene localización limitada con pocos niveles en cerebro o tejido mucoso. Está involucrada en patologías como Alzheimer o cáncer de mama (Chou, 2005).

- **Cisteín peptidasas.**

Estas peptidasas forman 16 familias diferentes y todas tienen un mecanismo catalítico común en el que participa un grupo tiol nucleofílico en una tríada catalítica (Kean y cols., 1993). El primer paso es la desprotonación de un tiol en el centro activo de la enzima por un aminoácido adyacente de cadena básica, usualmente un residuo de histidina. El siguiente paso es un ataque nucleofílico por parte del anión sulfhidrilo de la cisteína desprotonada sobre un sustrato carbonilo (Lin, 1996). En este paso, un fragmento del sustrato es liberado con un grupo amino terminal. El residuo de histidina de la proteasa es restaurado a su forma desprotonada y se forma un producto de la unión del intermediario éster tiólico con el nuevo grupo carboxilo terminal. La unión del éster tiólico es a continuación hidrolizada para dar sus componentes mientras se regenera el grupo carbonilo (Alphey y Hunter, 2006).

La mayor parte de estas proteasas son endopeptidasas, aunque también hay presente alguna familia de exopeptidasas. Dentro de este grupo se encuentran proteasas como la papaína (Kamphuis, 1984), con

INTRODUCCIÓN

una estructura como la anteriormente descrita y que se sitúa en la membrana plasmática donde interviene en el procesamiento de antígenos (Ewenstein, 1976) y otras, de estructura similar, como las integrantes de la familia de las catepsinas. Las catepsinas están involucradas en procesos proteolíticos durante el crecimiento, desarrollo y normal funcionamiento celular. La catepsina L y K son proteasas lisosomales que en roedores son secretadas por las células de Sertoli y actúan conjuntamente en los testículos (Anway y cols., 2004). La catepsina B está presente en los lisosomas (Yokota, 1986).

Una de las familias de cisteín peptidasas más importantes por su función en la muerte celular programada o apoptosis son las caspasas. Las caspasas son sintetizadas como precursores (procaspasas) y se convierten en enzimas maduras por señales apoptóticas. Las caspasas actúan hidrolizando numerosas proteínas localizadas en diferentes compartimentos intracelulares. Se clasifican en dos grupos, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras (Shi, 2004). Las caspasas iniciadoras, tales como la caspasa 9 en mamíferos, presentan un pro-dominio N-terminal con más de 90 aminoácidos que es importante para su función. Las caspasas efectoras, entre las que se encuentran las caspasas 3 y 7, presentan un pro-dominio N-terminal más pequeño de entre 20 y 30 aminoácidos. Todas las caspasas son sintetizadas por la célula como zimógenos catalíticamente inactivos. La activación de las caspasas efectoras es llevada a cabo por una caspasa iniciadora a través de un corte interno para separar la subunidad pequeña de la grande. Las caspasas iniciadoras se activan bajo condiciones apoptóticas, usualmente por complejos proteicos; por ejemplo, la caspasa 9 es activada por el apoptosoma (Rodríguez y Lazebnik, 1999). Aparecen procaspasas localizadas en el citosol y en mitocondrias y alguna como la procaspasa 2 aparece también en el núcleo (Zhivotovsky, 1999).

INTRODUCCIÓN

- **Metalopeptidasas.**

Las metaloproteasas son peptidasas que presentan unido un ión metálico, como Zn^{2+} o Ca^{2+} . El buen funcionamiento de las metaloproteasas depende de la unión de estos iones: el zinc se une al centro activo coordinando de dos a cuatro cadenas polipeptídicas laterales y el calcio se requiere para mantener la estructura conformacional (Pei y Kang, 2000). El ión metálico generalmente interactúa con la molécula de agua, aumentando su carga negativa necesaria para pasar al estado de transición tetraédrica a su vez necesario para promover hidrólisis.

Las metaloproteasas son excepcionalmente diversas y se conocen 25 familias diferentes (Rawlings y Barret, 1993). Estas enzimas son capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular, estructura dinámica que presenta un papel crucial en la arquitectura y la homeostasis, siendo una pieza clave en la estructura celular (Perez-Tamayo, 1974). Además, las metaloproteasas generan neoepítomos de la membrana celular, procesan mediadores bioactivos como citoquinas, quimoquinas y receptores de la membrana celular y tienen una importante función en la metástasis tumoral o en el desarrollo embrionario (Pardo y Selman, 2006).

Las metaloproteasas son secretadas como zimógenos y requieren activación por proteólisis limitada (Rajavashisth y cols., 1999). La mayoría de ellas son secretadas al espacio extracelular, pero hay otras que pueden encontrarse en el interior de la célula y pueden actuar sobre proteínas intracelulares (Limb y cols., 2005).

Dentro de las metaloproteasas aparecen la angiotensina que forma parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Duprez, 2006), adquiriendo un papel importante en la regulación del volumen sanguíneo y en la resistencia sistémica y, consecuentemente, en el control del gasto cardíaco y de la presión arterial.

Otras metaloproteasas que forman parte de la familia de la colagenasa degradan el colágeno, uno de los componentes fibrosos

INTRODUCCIÓN

mayoritarios del tejido conectivo extracelular, piel, tendones, pared celular y huesos (Harper, 1980).

Una importante familia de metaloproteasas es la familia de las carboxipeptidasas. Estas enzimas liberan aminoácidos de los extremos carboxilos de las proteínas. Presentan en su centro activo un residuo de serina, cisteína o zinc (Reznik y Fricker, 2001).

Las carboxipeptidasas están formadas por 14 miembros conocidos hasta el momento en los mamíferos (Huang y cols., 1999). Las carboxipeptidasas se pueden encontrar en distintas localizaciones, en vesículas secretoras neuroendocrinas, en el plasma, en la red trans-Golgi, en la placenta y tejidos embrionarios, en el corazón, en mastocitos y en el páncreas exocrino. Algunas de ellas son inactivas.

Las carboxipeptidasas también atacan específicamente a los sustratos según la acidez/basicidad de los mismos (Gardell, 1988).

Dentro de las carboxipeptidasas, se encuentra la subfamilia carboxipeptidasa A/B, importante para el desarrollo del presente trabajo como veremos más adelante por su localización en las células pancreáticas. Todos los miembros de esta subfamilia tienen un peso molecular entre 34 y 36 KDa y se presentan como zimógenos inactivos (Auld, 1998¹). Para su activación se requiere eliminar un segmento peptídico, en algunos casos por múltiples cortes de endopeptidasas (San Segundo, 1982). La función primaria de las tres carboxipeptidasas A y de la carboxipeptidasa B es actuar en el intestino junto con la acción de la tripsina y la quimotripsina sobre las proteínas ingeridas con la comida. Los miembros de esta subfamilia son óptimamente activos en un rango de pH neutro, reflejo del pH neutro del ambiente (Auld, 1998²; Avilés, 1998).

Las carboxipeptidasas A tienen preferencia por residuos básicos a pesar de su neutralidad, prefiriendo la A1 pequeños anillos aromáticos y cadenas alifáticas, y la A2 bolsillos de triptófano de cadena lateral (Gardell, 1988; Auld, 1998^{1, 2}).

INTRODUCCIÓN

La carboxipeptidasa B es óptimamente activa sobre residuos básicos, aunque también es capaz de romper algunos aminoácidos no básicos (Folk, 1971; Fricker, 1998).

- **Serín peptidasas.**

Las serín peptidasas también se denominan serín endopeptidasas porque no se conoce ninguna exopeptidasa dentro este grupo (Rawling y Barret, 1994) y son una clase de peptidasas que presentan un residuo de serina en el centro activo de la enzima. Aparecen cuatro clanes mayoritarios, el clan de la quimotripsina, el clan de la subtilisina, el clan de la alfa/beta hidrolasa y el clan de las peptidasas de señalización. También aparecen dentro de este grupo varias proteínas con ausencia de actividad enzimática como la azurocidina, el complejo del complemento III, haptoglobinas, apolipoproteína A, el factor de crecimiento hepático y la proteína Z. Las serín peptidasas participan en un amplio rango de funciones en el organismo, desde su contribución a las enzimas digestivas tanto en procariotas como eucariotas, a su participación en la coagulación y fibrinólisis (Kini, 2005), en la inmunidad y en la inflamación (Pham, 2006).

Los miembros del clan de la quimotripsina han sido encontrados sólo en animales, a excepción de dos tripsinas de *Ascomycetes* (Rawlings y Barret, 1993). Las peptidasas mejor conocidas de esta familia son la quimotripsina, la tripsina y la elastasa. Estas tres enzimas son secretadas en forma de zimógenos en las células acinares pancreáticas, llegando al intestino delgado donde se activan por la enteroquinasa, siendo responsables del catabolismo de las uniones peptídicas. Presentan una estructura similar y difieren en el tipo de enlace peptídico que rompen de una manera específica (Rawlings y Barret, 1994). Cada una de estas serín proteasas reconoce diferentes regiones de una cadena polipeptídica, situados en los alrededores de los residuos que cortan.

La quimotripsina es responsable de la hidrólisis de enlaces peptídicos de un grupo de aminoácidos básicos, teniendo preferencia por

INTRODUCCIÓN

la fenilalanina, el triptófano y la tirosina, que se acoplan a un “bolsillo” hidrofóbico (Rawlings y Barret, 1994).

La tripsina es responsable de la hidrólisis de enlaces peptídicos que unen residuos de aminoácidos cargados positivamente. En vez de unirse a un bolsillo hidrofóbico, la tripsina presenta un residuo de ácido aspártico en la base del bolsillo. Éste puede interactuar con residuos cargados positivamente tales como la arginina o lisina (Rawlings y Barret, 1994).

La elastasa es responsable de la excisión de enlaces peptídicos que unen pequeños aminoácidos neutros como la alanina, la glicina y la valina. Estos residuos aminoacídicos están presentes de una manera abundante en el tejido conectivo de los músculos. El bolsillo que presentan la tripsina y la quimotripsina puede llegar a unir residuos de valina y treonina, modificando su estructura tridimensional y permitiendo acomodarse a pequeños aminoácidos (Rawlings y Barret, 1994).

La combinación de las tres enzimas forma un “equipo” increíblemente efectivo en la digestión y son las principales responsables de la digestión de las proteínas.

- **Glutamil peptidasas**

En este grupo se encuentran unas pocas endopeptidasas, carboxil peptidasas de hongos y bacterias. Según su estructura terciaria, se asemejan bastante a las serín peptidasas pertenecientes a la familia de la subtilisina, solo que en vez de presentar una histidina en su centro activo presentan un residuo glutamato (Fujinaga y cols., 2004). Estos péptidos actúan a pH ácido, y el ambiente de los carboxilatos contribuye al bajo pH óptimo de estas enzimas.

- **Treonín peptidasas**

Las treonín peptidasas se caracterizan por presentar una treonina en el grupo amino terminal de la enzima madura. En eucariotas, estas

INTRODUCCIÓN

proteasas forman una familia que presenta al menos 14 genes que codifican para múltiples subunidades de un complejo proteolítico llamado proteasoma. El proteasoma determina el recambio proteico controlando la transducción de señales, el procesamiento/presentación de antígenos y la regulación del ciclo celular (Mordmuller, 2006). El proteosoma es el responsable de la degradación de la mayoría de las proteínas citosólicas; estas proteínas deben estar ubiquitinadas para poder ser degradadas por el proteasoma (Chai y cols., 1999).

3.2. Implicación de las proteasas y peptidasas en la muerte celular y en el desarrollo de la pancreatitis aguda.

Existen dos tipos principales de muerte celular, como son la apoptosis y la necrosis.

La apoptosis, también denominada muerte celular programada, es necesaria para el desarrollo normal de los tejidos, pero puede darse también en situaciones patológicas. Además de disminución de su tamaño y de sus orgánulos, otras peculiaridades que sufre una célula apoptótica son la condensación de la cromatina, rupturas de su DNA intranucleosomal y la translocación de fosfatidil serina desde la cara interna de la membrana plasmática hasta la cara externa. La fosfatidilserina en la superficie de las células apoptóticas es reconocida por macrófagos que van a fagocitarlas, sin producirse liberación del contenido celular al tejido y con una mínima inflamación (Pandol y cols., 2007).

La necrosis ocurre en situaciones patológicas y representa una respuesta celular severa en respuesta a un daño. La necrosis esta asociada con disfunción mitocondrial, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido celular al espacio extracelular. En la necrosis se produce un menor daño al DNA respecto a la apoptosis (Pandol y cols., 2007).

En la apoptosis se produce la activación de caspasas iniciadoras (como las caspasas 8 y 9), que van a activar a caspasas efectoras (como las

INTRODUCCIÓN

caspasas 3 y 7) y alteraciones mitocondriales como la depolarización, permeabilización y liberación de factores (citocromo C). Se piensa que la permeabilidad ocurre por la apertura de los poros de permeabilidad transitoria. Inhibidores de estos poros (como la ciclosporina A) son capaces de prevenir la liberación de citocromo C, inhibiendo la activación de caspasas y la apoptosis en células pancreáticas de ratas. La colecistoquinina (CCK) a dosis supramáximas, el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y el lipopolisacárido (LPS) causan apoptosis de las células pancreáticas *in vitro*, y la permeabilidad transitoria esta regulada por miembros de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL), que la inhiben, así como y otras proteínas (Bax, Bak, Bad, Bid, Bcl-xS) que la aumentan (Gomez y cols., 2001; Evans y cols., 2001).

Los mecanismos que controlan la necrosis esta siendo actualmente bajo un profundo estudio. En general, esta consensuado que los altos niveles intracelulares de adenosin trifosfato (ATP) conducen a la necrosis y niveles deplecionados de ATP inducen apoptosis (Eguchi y cols., 1996; Proskuryakov y cols., 2003; Gukowskaya y cols., 2004). De este modo, como la mitocondria es la principal fuente productora de ATP, la necrosis ocurre cuando el daño mitocondrial produce alteraciones mayores que cuando se induce la apoptosis.

Existen numerosas investigaciones que relacionan la apoptosis y la necrosis con la pancreatitis aguda (Pandol y cols., 2007), por tanto, cabe destacar en este apartado el importante papel en la muerte celular que representa una familia de cisteín proteasas como las caspasas.

Además de las caspasas, otras proteasas han sido involucradas en la pancreatitis aguda, y la activación de los zimógenos es clave en su evolución. La cisteín proteasa lisosomal más abundante en el páncreas es la catepsina B, y se ha demostrado que juega un papel importante tanto en la necrosis, como en la apoptosis, en multitud de tipos celulares (Gukowskaya y cols., 2004). Su inhibición frena la necrosis pero no la apoptosis en modelos experimentales de pancreatitis (Halangk, 2000, Gukovsky y cols., 1998).

INTRODUCCIÓN

Parece que los efectos de la catepsina B son debidos a su acción sobre el tripsinógeno, produciendo la activación de la tripsina y se ha sugerido que durante la necrosis se produce la activación de la tripsina, mientras que cuando se induce el mecanismo apoptótico se produce la inhibición de su actividad (Pandol, 2006).

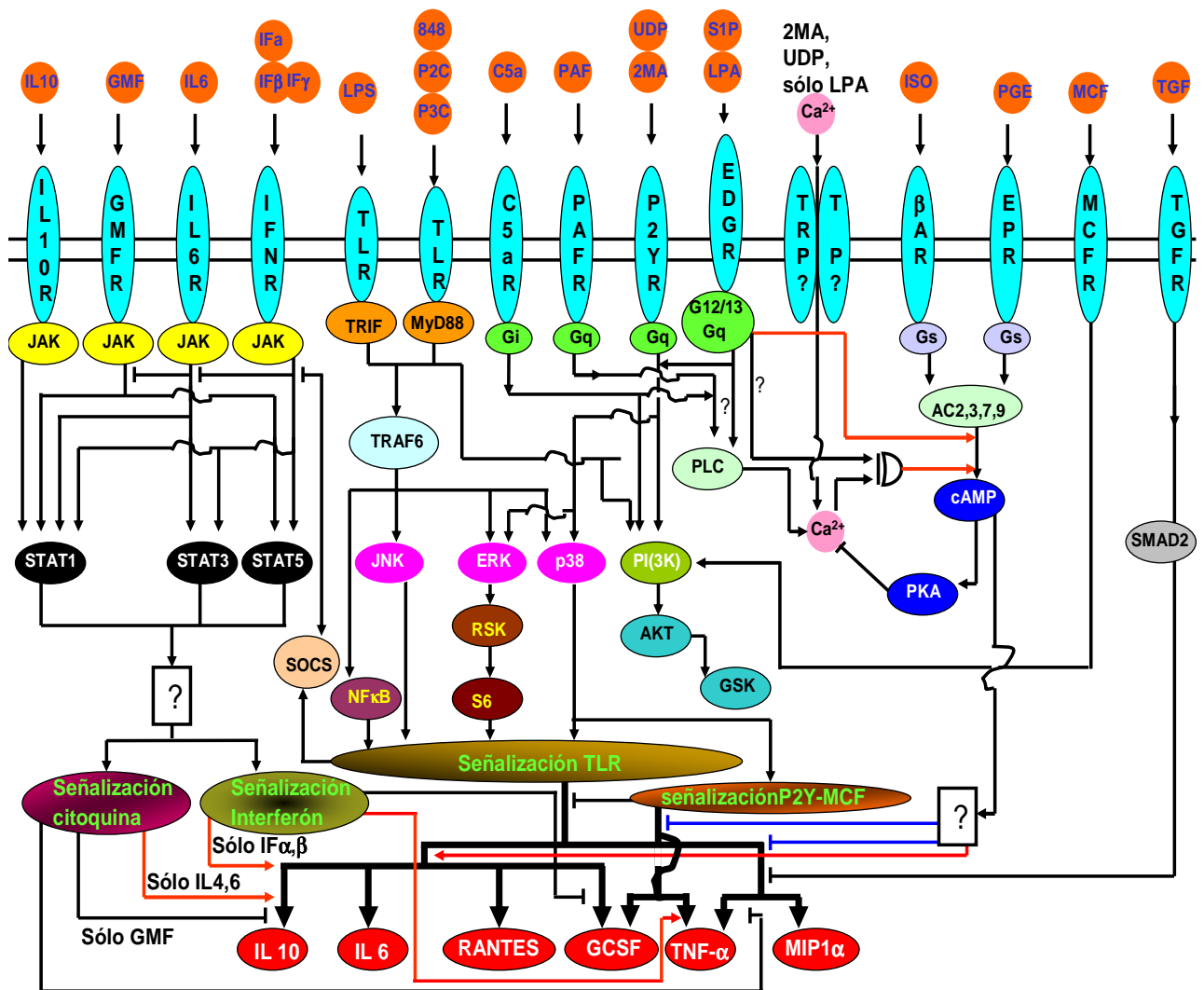
4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN LA INFLAMACIÓN AGUDA.

Bajo el término “transducción de señales” se agrupan los mecanismos por los cuales estímulos extracelulares que llegan a la membrana plasmática de la célula se convierten en respuestas celulares específicas que permiten la adaptación a cambios en el medio externo, así como el mantenimiento de la homeostasis. La transducción de una señal desde la membrana plasmática y su propagación en el interior celular se realiza por activación de distintas proteínas, entre las que podemos encontrar quinasas y fosfatasa, organizadas en lo que se conoce como “cascadas de señalización”. Estas cascadas pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos entre los que se incluyen las hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y agentes que dañan el ADN. La organización de las proteínas quinasas en cascadas de señalización es importante porque permite amplificar, diversificar e integrar las distintas señales que recibe la célula.

Un aspecto a tener en cuenta es que las células están recibiendo constantemente numerosos estímulos de diferente naturaleza, lo que implica una multitud de mensajes de distinta índole. Para responder a todos estos estímulos las células han desarrollado una manera de individualizar y separar la naturaleza de los estímulos activando una vía de señalización u otra, aunque en muchas ocasiones esas vías de comunicación inevitablemente acaban por entrecruzarse (figura 14) (Natarajan y cols., 2006).

INTRODUCCIÓN

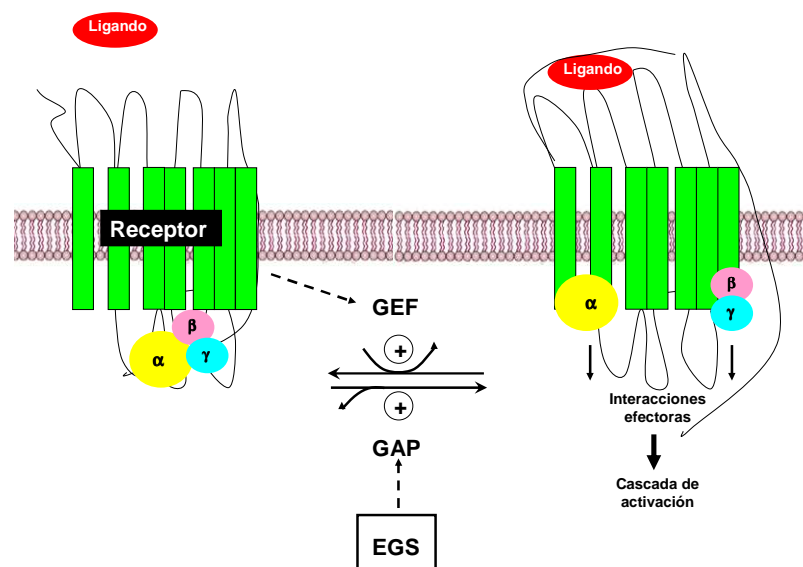
Figura 15.- Principales vías de transducción de diferentes estímulos extracelulares.



INTRODUCCIÓN

La diferenciación e integración de los estímulos es llevada a cabo por proteínas receptoras de membrana, entre las que hay que destacar los receptores de membrana de la familia de proteínas acopladas a la proteína G (GPCR), que poseen dominios proteicos de membrana y dominios extra e intracelulares, unidos a la proteína G heterotrimérica que van a participar en su activación (figura 15). Dependiendo del tipo de receptor que se active funcionará una vía de señalización u otra.

Figura 16.- Representación de uno de los modelos de activación de GPCRs.
(Hollinger y cols., 2003)



Aunque las señales que lleguen al interior celular sean de la misma naturaleza, pueden no ser de la misma intensidad. La interacción espacio-temporal de las enzimas componentes de la vía va a estar regulada por la homeostasis celular, y pueden tener lugar 4 posibles respuestas, en función del estímulo: basal, de frenado, adaptativa y de activación. Este mecanismo neutraliza la señal del estímulo y la devuelve hacia el exterior en retroalimentación negativa del propio estímulo. Cuanto más intenso es el estímulo, más fuerte será la respuesta hasta que el estímulo desborde el

INTRODUCCIÓN

mecanismo y se dispare la activación de la cascada de señalización correspondiente (Brandman y Meyer, 2008).

Las principales vías de activación implicadas en la inflamación, y en concreto en la PA, son las vías de las MAP quinasas, la vía del fosfatidilinositol-3-fosfato proteína quinasa (PI3K), el transductor de la señal de la quinasa Janus (JAK-STAT) y la ruta de activación del factor nuclear kappa B (NFκB) (figura 15).

El final de todas las vías de señalización es la activación o represión de factores de transcripción que van a mediar en la inducción o represión génica de las enzimas necesarias para realizar la orden. Entre los principales factores de transcripción se encuentran, NFκB, C-MYC, y el factor activador de la proliferación peroxisomal 1 (AP-1), los tres son redox-sensitivos y mediadores de procesos inflamatorios (De Nigris y cols., 2001).

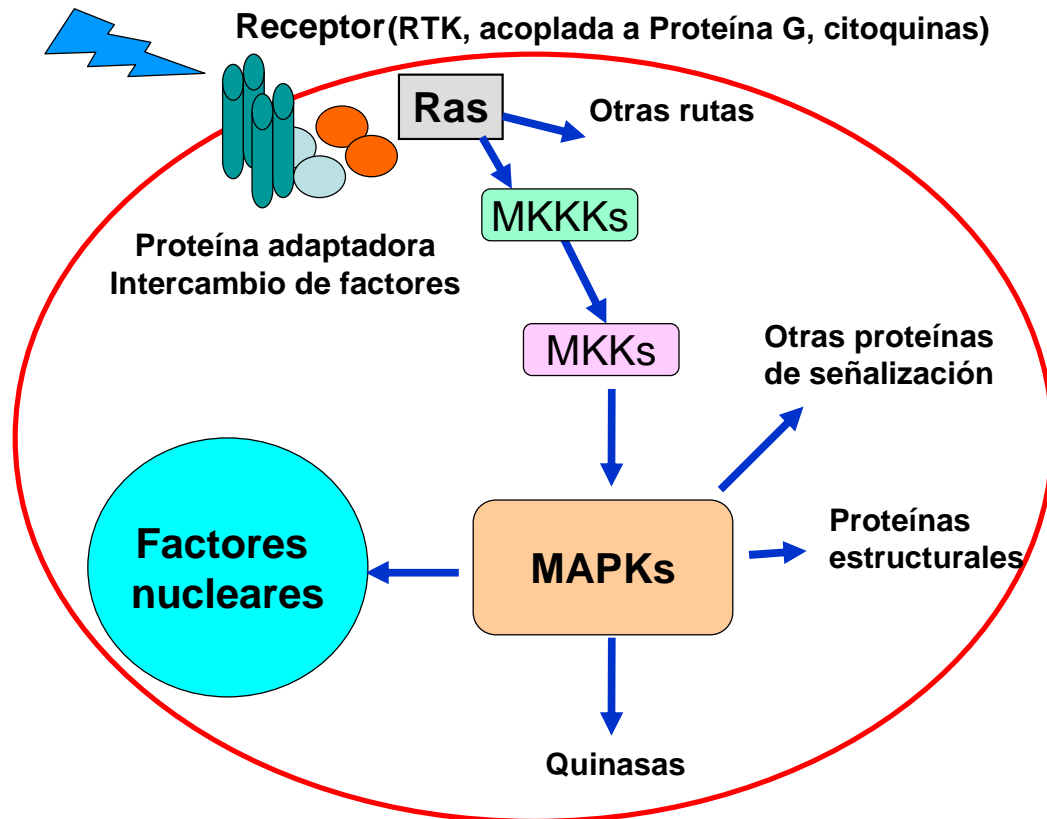
4.1. Proteína quinasas activadas por mitógenos, MAP quinasas (MAPK).

Las MAP quinasas son las más antiguas y mejor conservadas vías de señalización y son cruciales en la respuesta inmune. Son una familia de enzimas que forman una red integrada para llevar a cabo funciones celulares de control de diferenciación, proliferación y muerte celular (Turjanski y cols., 2001). El hecho de que las MAP quinasas sean activadas rápidamente en procesos inflamatorios ha conducido a considerarlas como posibles dianas para el tratamiento de patologías de origen inflamatorio, entre ellas la PA (Pereda y cols., 2004; Samuel y cols., 2008).

Se distinguen tres grandes grupos de cascadas reguladoras de MAP quinasas en humanos que conducen a modificar la expresión génica. Estas tres familias son la familia de ERK 1/2 (quinasa regulada por señales extracelulares), la familia de JNK (quinasa N-terminal de jun) y la proteína quinasa activada por estrés (SAPK)/p38.

INTRODUCCIÓN

Figura 17.- Esquema general de las vías de las MAP quinasas.



MKKK → MAP quinasaquinasa quinasa.

MKK → MAP quinasa quinasa.

4.1.1. ERK 1/2.

La familia de ERK 1/2 (quinasa regulada por señales extracelulares), fue la primera en ser caracterizada, siendo un mediador vital de un número importante de transformaciones celulares que incluyen

INTRODUCCIÓN

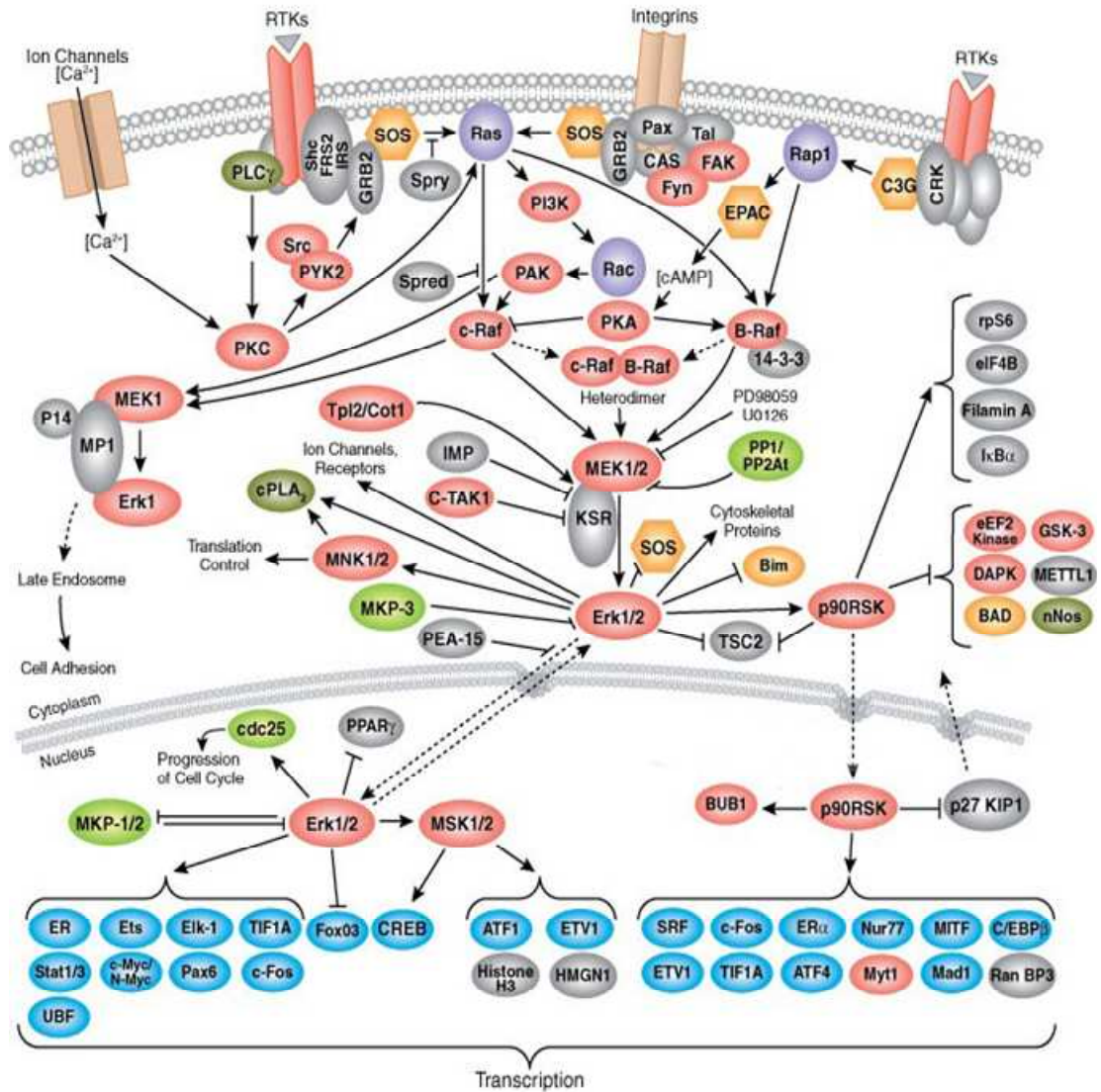
el crecimiento, la proliferación y la supervivencia. Hay dos isoformas de ERK que se expresan ubicuamente, ERK 1 y ERK 2. En ocasiones se las denomina MAP quinasas p42/p44 en función de su tamaño molecular (Boulton y cols., 1991).

La cascada de señalización de ERK 1/2 es activada por una amplia variedad de receptores (receptor de tirosín quinasas, integrinas, canales iónicos, etc) que responden a diferentes estímulos como factores de crecimiento, hormonas y otros. Los componentes específicos de esta cascada varían según el estímulo, pero normalmente incluyen un adaptador (Shc, GRB2, etc.) que une el receptor a un factor cambiador de nucleótidos de guanina (Sos, C3G, etc), que a su vez transduce la señal a proteínas de unión a GTP (Ras, Rap1). Estas activan el esqueleto principal de la vía, las MAPKKKs o MEKKs (por ejemplo Raf), que a su vez activan a las MAPKKs o MEKs (por ejemplo MEK 1/2) y que finalmente activan a las MAPK (como ERK 1/2). Las quinasas ERKs pueden activar a diferentes factores de transcripción que regulan la expresión génica, tales como son ELK-1, ETS-2, C/EBP- β , c-FOS, c-MYC, c-JUN, ATF-2, etc. (figura 17) (Sawey y cols., 2008).

Aunque inicialmente se pensó que el papel de ERK 1/2 se restringía al crecimiento celular y a la proliferación, parece claro que muchos procesos inflamatorios están relacionados con la activación de ERK 1/2 (Lawrence y cols., 2008; Ananieva y cols., 2008).

INTRODUCCIÓN

Figura 18.- Vía de señalización de ERK 1/2.



Legenda:

- | | | |
|---|--|---|
| ● Quinasa | \longrightarrow Modulación directa estimuladora | \longleftarrow Estimulación transcrip. |
| ● Fosfatasa | \longleftarrow Modulación directa inhibitoria | \longleftarrow Inhibición transcrip. |
| ● Factor de transcripción | $\longrightarrow \longrightarrow$ Modulación estimul. en cascada | $\cdots \longrightarrow$ Translocación |
| | $\longrightarrow \longleftarrow$ Modulación inhib. en cascada | $\longleftarrow \longleftarrow$ Excisión de subunidades |
| | \dashrightarrow Tentativa de modulación estimul. | $\longleftarrow \longleftarrow$ Unión de subunidades |
| | $\dashrightarrow \longleftarrow$ Tentativa de modulación inhib. | |

© cell signalling technology.

INTRODUCCIÓN

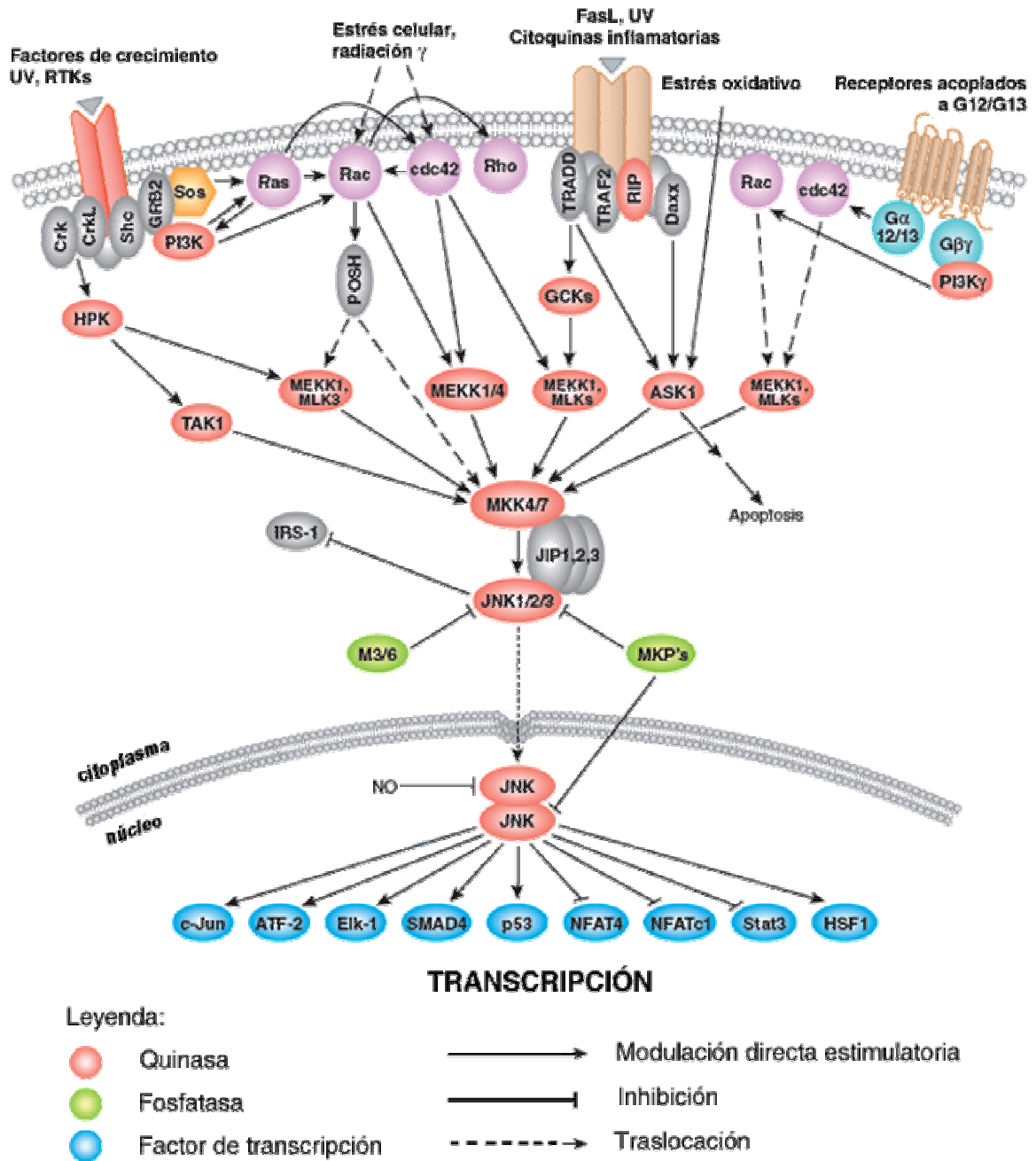
4.1.2. JNK.

La familia de quinasas de la vía JNK se activa por diferentes estímulos entre los que se encuentran factores ambientales (radiación ultravioleta o gamma), patógenos (virus de doble cadena), citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1), o factores de crecimiento (Weston y Davis, 2007).

La señal se transduce a través de una cascada iniciada por los miembros de la familia Rho (Rac, Rho, cdc42), que a su vez activan a una de las decenas de MAPKKs, normalmente MEKK1/4, aunque no se conoce exactamente la relevancia de cada quinasa en la transducción de cada estímulo. De forma secuencial se fosforilan y activan las MAPKKs, siendo la MAPKK 7 la activada cuando el estímulo es por citoquinas proinflamatorias, mientras que son tanto MAPKK 4 y MAPKK 7 las que se activan en respuesta a elementos ambientales. Finalmente las quinasas JNK (de las que se han descrito tres isoformas JNK 1, JNK 2, JNK 3) son activadas y se translocan al núcleo donde regulan la actividad de diferentes factores de transcripción tales como c-JUN, ATF-2, ELK-1 o p53 que, en definitiva dirigen la respuesta celular de crecimiento, diferenciación y apoptosis (figura 18) (Kyriakis, 2001). Respecto a procesos nosológicos, JNK tiene un papel importante en la obesidad crónica, donde se ha visto que aparece activa de manera latente favoreciendo la resistencia a la insulina a través de la regulación de la acumulación de lípidos (Solinas y cols., 2007).

INTRODUCCIÓN

Figura 19.- Vía de señalización de JNK.



© cell signalling technology.

INTRODUCCIÓN

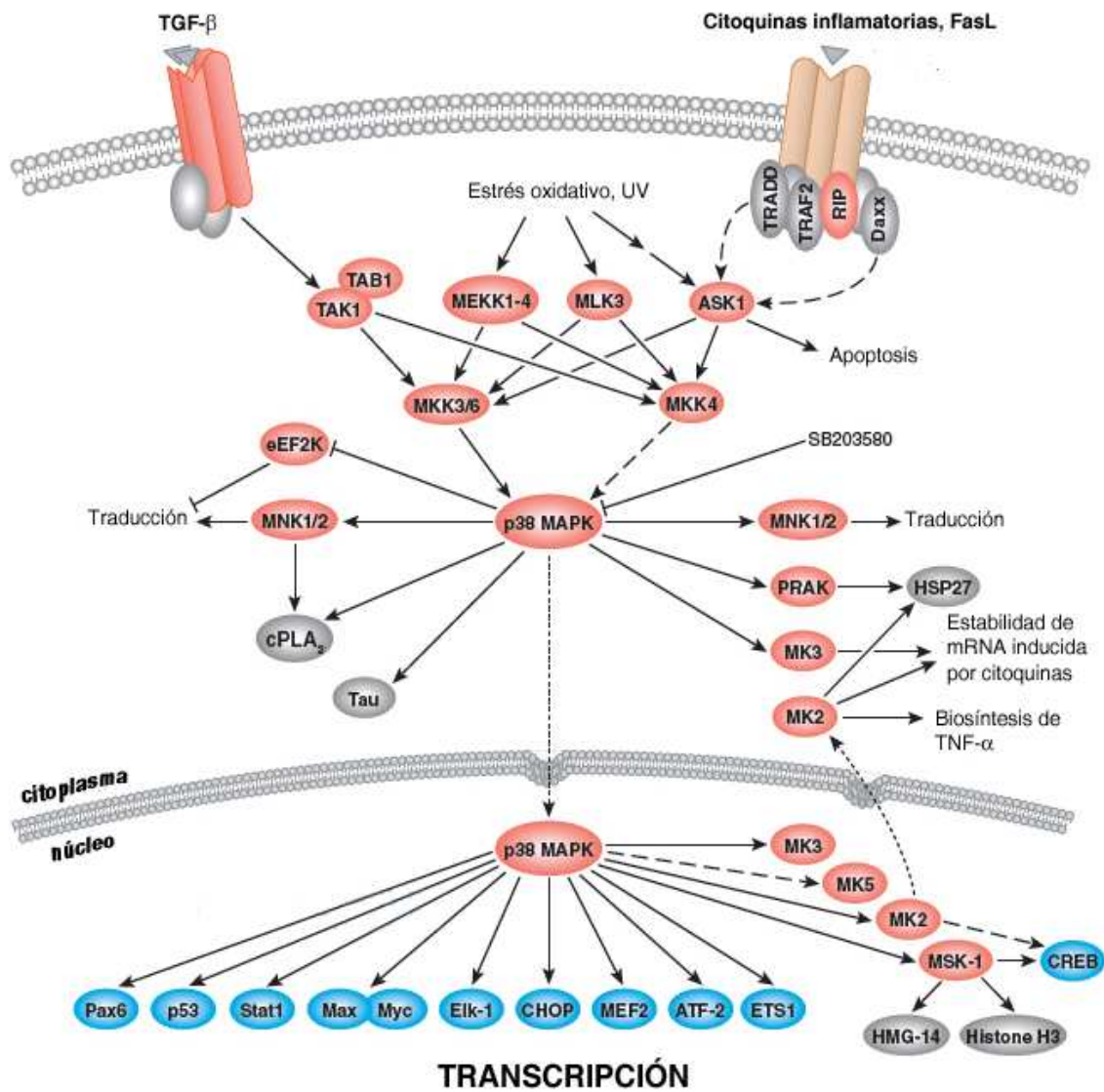
4.1.3. p38.

Los miembros de la familia de las MAP quinasas p38 son activadas por una gran variedad de factores ambientales (rayos ultravioleta, hipoxia, etc), patógenos (estafilococos, virus herpes simple 1, enterotoxina B, etc), citoquinas inflamatorias (IL-1, TNF- α) y factores de crecimiento (eritropoyetina, factor de estimulación de colonias de macrófagos). Esta familia de quinasas regula diferentes respuestas celulares como inflamación, crecimiento y muerte celular (Ashwell, 2006). Existen 4 isoformas de p38 (α , β , δ y γ), pero en la mayoría de las células inflamatorias la forma alfa es la que predominantemente está activada (Ono y Han, 2000).

Como en la ruta anterior, el componente próximo a la membrana es una MAPKKK (TAK1) que es activada por estímulos apoptóticos y citoquinas inflamatorias. Así pues, TAK1 fosforila y puede activar a una de las MAPKK 3,4 ó 6 y estas MAPKKs transducen la señal a la MAPK p38 Finalmente la MAPK p38 activa la síntesis de diferentes genes que codifican para citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , etc), enzimas intracelulares (COX-2, NOS-2) o moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 mediante la activación de diferentes factores de transcripción como NF κ B, ATF-2, STAT-1, MEF-2, ELK-1, C/EBP β , CREB, ATF-1 o SRF (figura 19) (Ono y Han, 2000).

INTRODUCCIÓN

Figura 20.- Vía de señalización de p38.



Leyenda:

- | | |
|---|---|
| ● Quinasa | \longrightarrow Modulación directa estimuladora |
| ● Fosfatasa | \longleftarrow Inhibición |
| ● Factor de transcripción | \dashrightarrow Traslocación |

© cell signalling technology.

INTRODUCCIÓN

4.1.4. Interacciones entre las 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 a dos niveles diferentes: activadores por encima de las MAP quinasas e inactivadores por debajo de las mismas. El ejemplo más destacado es la GTPasa p21 Rac, que es activada por varios mediadores de inflamación, en concreto por el factor estimulador de colonias 1 y por el TNF- α (Peppelenbosch y cols., 1999). Rac activa la quinasa MEK p38 PAK al menos en células mieloides y linfoides (Blume-Jensen y Hunter, 2001), que secuencialmente activa MKK3, 4, 6 y 7. Así, es responsable de la activación simultánea de p38 y de JNK, característica general observada en la mayoría de las reacciones proinflamatorias (Minden y cols., 1995). Además, por debajo del alcance de las MAP quinasas existen también interacciones cruzadas. Cuando se activan las MAP quinasas, se puede producir la activación de las llamadas fosfatasas de especificidad dual (DSP) u otras fosfatasas, que desfosforilan las MAP quinasas y restringen su acción a un corto periodo de tiempo. Puesto que la especificidad de estas fosfatasas es limitada, la activación de una MAP quinasa puede resultar en la desactivación de otras MAP quinasas. Así, se pueden por un lado activar varias MAP quinasas simultáneamente, o inhibirse una por la activación de otra, y de estos dos procesos predominará uno dependiendo como es lógico, del contexto celular en que suceda.

4.2. Regulación de la señalización por fosforilación reversible. Fosfatasas y modulación de las MAPK.

La activación de las MAPK por fosforilación es reversible y es frenada por la acción de las fosfatasas. Por la regulación que las MAPK ejercen sobre la expresión génica en la respuesta inmune, las fosfatasas,

INTRODUCCIÓN

presentan un papel muy importante en la regulación negativa de la respuesta celular (Hunter y cols., 1995). Se conocen alrededor de 518 proteínas quinasas, pero sólo 140 fosfatasa (Arena y cols., 2005). Sin embargo, la desfosforilación está mucho más activa que la fosforilación en condiciones normales.

Según los residuos que defosforilen, existen dos grandes grupos, las serín/treonín fosfatasa (PPPs), que defosforilan residuos de serina o treonina, y las tirosín fosfatasa (PTPs), que defosforilan residuos de tirosina. Dentro de las tirosín fosfatasa están incluidas las fosfatasa de especificidad dual (DSP), que son capaces de defosforilar residuos de tirosina y de treonina (Camps y cols., 2000). Las fosfatasa también se distinguen por las moléculas que inhiben su acción, así por ejemplo el fluoruro sódico (NaF) es inhibidor específico de serín/treonín fosfatasa (Oliver y cols., 1998), mientras que el vanadato es inhibidor específico de tirosín fosfatasa (Burke y cols., 1998).

4.2.1. Serín/treonín fosfatasa (PPPs).

Este grupo está formado por cuatro tipos de metaloproteínas que se clasifican en dos familias: PPP formada por la PP1, PP2A y PP2B, también conocida como calcineurina, y la familia PPM formada por la PP2C. La PP1, PP2A, y PP2B se forman por asociación de varias subunidades mientras que la PP2C es una proteína monomérica. También se diferencian por la preferencia de sustrato, la necesidad de cationes metálicos y la sensibilidad a diferentes inhibidores (Cohen, 1989). Las PPPs están involucradas en procesos tan importantes como el control del ciclo celular, la regulación del crecimiento y la división celular (Wang y cols., 2008).

INTRODUCCIÓN

- **Proteín fosfatasas de tipo 1 (PP1).**

Las PP1 desfosforilan preferentemente la subunidad β de la fosforilasa quinasa y necesitan la presencia de manganeso para ser activas (Zhang y cols, 1998). Comparte inhibidores específicos con la PP2A, como el NaF, la microcistina y el ácido okadaico (Campos y cols., 1996) y en estudios con estos inhibidores han revelado que son las PPPs más activas en extractos celulares (Wang y cols., 2008). También es inhibida por la actividad de unos polipéptidos denominados inhibidor 1 y 2. La inhibición de la PP1 por el inhibidor 1 es dependiente de AMPc. (Huang y cols., 2005). Se sabe que la PP1 participa en procesos biológicos como la fertilidad varonil ya que regulan la movilidad de los espermatozoides mediada por el AMPc (Han, 2007).

- **Proteín fosfatasas de tipo 2 (PP2).**

Las PP2 se diferencian de las anteriores porque desfosforilan preferentemente la subunidad α de la fosforilasa quinasa y por no responder a los inhibidores 1 y 2. Los tres tipos de PP2 se diferencian entre sí por los cationes divalentes que requieren.

La subfamilia PP2A está compuesta por dos subunidades reguladoras A y B y una catalítica, la C. Existen diferentes isoformas que presentan variaciones de sus subunidades. La subunidad A es miembro de la familia proteica HEAT (*huntington elongation-A-subunit.TOR*), y regula la formación del complejo. Cuando la subunidad A se une a la C, presenta actividad catalítica incluso en ausencia de la B. Las secuencias de las subunidades A y C aparecen muy conservadas en eucariotas, mientras que la subunidad B es más heterogénea y se cree que puede ser clave del control sobre su localización y especificidad de las diferentes holoenzimas. Las células eucariotas expresan cuatro clases de subunidades B, PR55, B56/PR61, PR72 y PR93/PR110, apareciendo al menos 16 miembros entre esta subfamilia. Además, la asociación y actividad de la PP2A está regulada también por modificaciones post-traduccionales y requiere la

INTRODUCCIÓN

presencia de manganeso (Xing y cols., 2006); el AMPc aumenta su actividad (Hong y cols., 2008).

La PP2A presenta propiedades antiapoptóticas (Lires-Deán y cols., 2008), aunque regula la fosforilación de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 (Pérez Galán y cols., 2008) y proapoptóticas FOXO I (Yan y cols., 2008) y puede tener relación con el control que tiene sobre los niveles de calcio y potasio. Se ha descrito que la PP2A junto la proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII) regula las bombas de K^+/Ca^{2+} (Imig y cols., 2008). También se ha publicado recientemente que la PP2A podría estar involucrada en el aumento de la producción de NO en neuronas hipotalámicas, producido por activación de la nNOS inducida por un aumento del Ca^{2+} y por la desfosforilación de la propia nNOS (Xu y Krukoff, 2007).

La subfamilia PP2B, o calcineurina, es dependiente del complejo Ca^{2+} /calmodulina (Klee y cols., 1998) y en mamíferos regula diferentes procesos inmunológicos como la activación de las células T y la producción de citoquinas (Boleslawski y cols., 2004), la quimiotaxis de neutrófilos (Lawson y Maxfield, 1995), la apoptosis (Wang y cols., 1999), la hipertrofia cardiaca (Molketin y cols., 1998), la memoria (Mansuy y cols., 1998) y la angiogénesis (Graef y cols., 2001). Todas estas funciones fisiológicas las realiza por la regulación de factores transcripcionales de la familia NFAT (factor nuclear de células T activadas) (Walczak-Drzewiecka, 2008). La calcineurina es inhibida por drogas inmunosupresoras como la ciclosporina y la FK506 (Neye, 2004)

La subfamilia PP2C engloba isoformas monoméricas de unos 42KDa, que muestran especificidad de sustrato y son dependientes de los cationes divalentes manganeso o magnesio. Se conocen varias isoenzimas en mamíferos, la PP2C α , β , γ , δ y ϵ y actúan en respuesta al estrés celular (Das y cols., 1996). También participan modulando varias vías de señalización como la de $TNF\alpha$ -ASK1-JNK, que se inactiva por la PP2C ϵ y se activa por acción de la PP2C γ y participa en la estimulación de la apoptosis o la de Integrina-ILK-GSK3 β - β -catenin que participa en la proliferación celular y supervivencia. (Tamura y cols., 2006). La PP2C actúa en

INTRODUCCIÓN

respuesta al estrés celular y participa en la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Das y cols, 1996).

Estructuralmente, la PP2C no está muy relacionada con las PPPs; sin embargo, presenta una extraordinaria similitud con la subunidad catalítica de la fosfatasa de la piruvato deshidrogenasa (PDPC), que cataliza la desfosforilación y reactivación de la subunidad α del complejo de la piruvato deshidrogenasa (Lawson y cols., 1993). La PDPC es una enzima mitocondrial y como la PP2C es manganeso dependiente.

4.2.2. Tirosín fosfatasas (PTPs).

Hasta los años ochenta, sólo se conocía la fosforilación de residuos de serina y treonina. Sin embargo, la fosforilación de residuos de tirosina empezó a tomarse en cuenta desde que se describió en el sarcoma de Rous producida por la tirosín quinasa v-Src, siendo la fosforilación de los residuos de tirosina entre un 0,01-0,05% de la fosforilación total (Walton y Dixon, 1993). La fosforilación de residuos de tirosina es clave en la regulación de la transducción de señales durante numerosas funciones de la célula eucariota, incluyendo activación, progresión celular, movimiento celular, cambios estructurales, apoptosis, diferenciación y homeostasis (Chiarugi, 2005). *In vivo* la fosforilación de tirosinas es reversible y dinámica; los estados de fosforilación están gobernados por la acción opuesta de las proteín tirosín quinasas, PTKs, y las PTPs.

Las ROS actúan como segundos mensajeros en muchos procesos celulares como las cascadas de MAP quinasas, expresión génica, regulación, proliferación y senescencia. El estrés oxidativo también modula la fosforilación de tirosinas. La oxidación transitoria de los tioles de las PTPs conduce a su inactivación por la formación de puentes disulfuros intramoleculares o por la formación de sulfoamidas, inversamente a lo que ocurre en la oxidación de las PTKs, que las conduce a su activación directamente por modificaciones de los tioles, e indirectamente por la inhibición de las PTPs (Chiarugi, 2005).

INTRODUCCIÓN

Se han descubierto más de 200 PTPs y todas presentan conservado el motivo CX5R también conocido como P-loop porque es de unión al fosfato (Tabernero y cols., 2008). Se han descrito la presencia de PTPs de membrana y citoplasmáticas (figura 20).

Las tirosín fosfatasas citoplasmáticas también llamadas solubles o no receptoras presentan una alta modulación y, además del dominio P-loop, presentan otros dominios claves en la señalización celular, regulando la actividad enzimática o el reclutamiento específico de ligandos (Alonso y cols., 2004). Dentro de este grupo se puede destacar la PTP1B, que se localiza en el citoplasma pero migra al retículo endoplasmático (Frangioni y cols., 1992) y está involucrada en la regulación negativa de MAPK o en el metabolismo de la glucosa, la resistencia a la insulina y el control del peso corporal, probablemente regulando negativamente la vía de las leptinas (Koren y Fantus, 2007). En la actualidad se investiga como una posible diana para el tratamiento de la obesidad (Koren y Fantus, 2007). Otras PTPs solubles son la SHP1 (Src homology 1) que regula la señalización de células hematopoyéticas y el metabolismo de la glucosa (Dubois y cols., 2006), la SHP2 (Src homology 2) que aunque estructuralmente es similar a la SHP-1 difiere en la especificidad de sustrato (Xu y cols., 2002) y entre sus funciones está la de regular la actividad de la familia SRC quinasa y la activación de Ras/ERK (Zhang y cols., 2004); la PTP1C que aparece en plaquetas, presenta una elevada homología con la SHP-2 y podría estar modulada por la endotelina-1 (Catalán y cols., 1997). Finalmente otras PTPs son la HePTP, PTPRR y STEP, que pertenecen a un grupo de PTPs solubles que presentan un dominio denominado KIM que participa en la desfosforilación ERK 2 (Tabernero y cols., 2008).

Existen unas 38 tirosín fosfatasas de membrana, de las cuales 21 son receptores de membrana tipo I (Alonso y cols., 2004) que antes de atribuírseles ningún sustrato se denominaron como receptores de PTPs (RPTPs) (Hunter y cols., 1989). Típicamente, una RPTP presenta la región N-terminal extracelular y su longitud varía entre 100 y más de 1000 aminoácidos, con un solo dominio de membrana y uno o dos dominios catalíticos intracelulares altamente conservados con otras PTPs (Tonks y cols., 2006). Por su estructura las RPTPS son idóneas para propagar la

INTRODUCCIÓN

señalización a través de la membrana plasmática, empezando por la unión a ligandos extracelulares (Tonks y cols., 2006).

A pesar de numerosos esfuerzos durante las últimas dos décadas, se conocen pocos de sus ligandos extracelulares, como proteoglicanos de tipo heparán sulfato que une RPTPs de tipo IIIa (Aricescu y cols., 2002) o agrín y colágeno XVIII que se une a su homóloga RPTP σ aviar (Aricescu y cols., 2002).

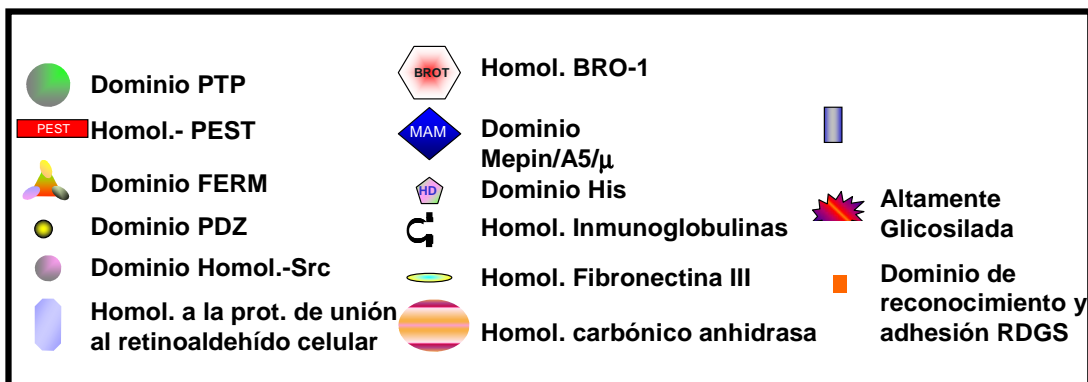
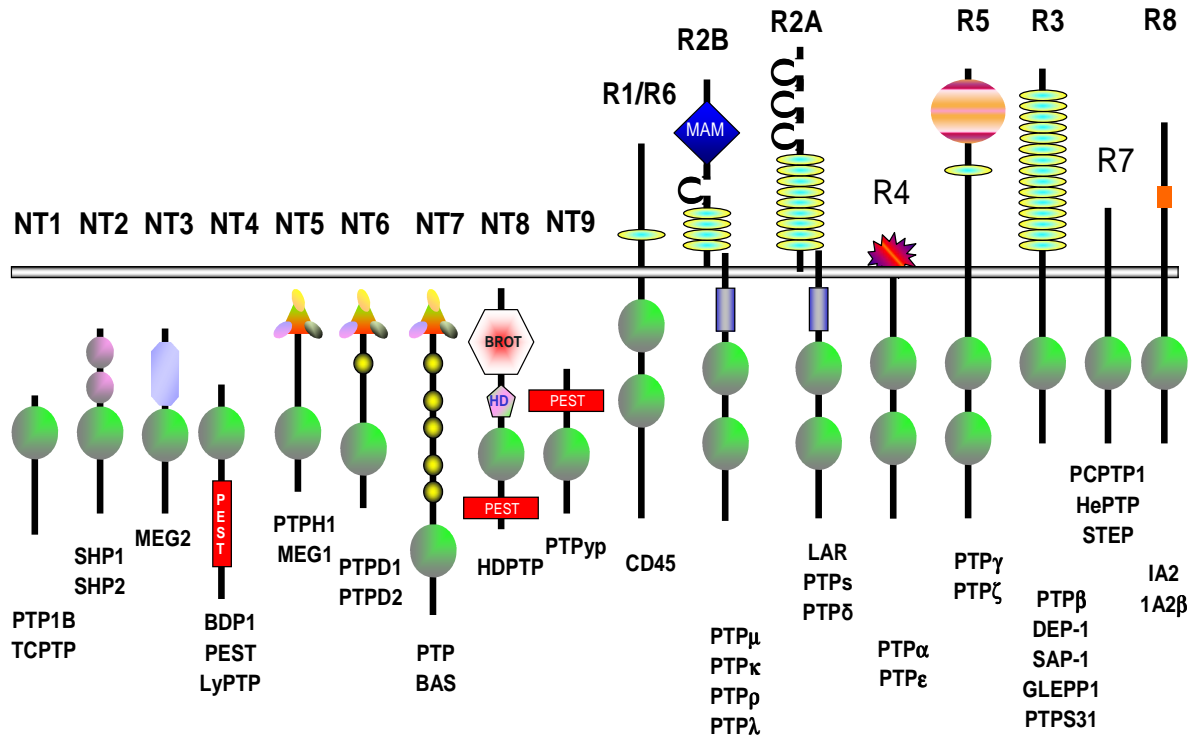
Cabe destacar dentro de este grupo la tirosín fosfatasa CD45, que aparece de manera muy abundante en los linfocitos T, regulando su señalización y la respuesta inmune (Zamoyska, 2007).

4.2.3. Fosfatasas de especificidad dual (DSPs).

Las DSPs se consideran una familia dentro de las tirosín fosfatasas y se caracterizan por regular negativamente las vías de las MAPK; por eso también se denominan MKPs (MAPK *phosphatases*) (figura 21). La primera DSP identificada en mamíferos correspondía al gen temprano *3ch134* y luego se describió su ortólogo humano *cl-100* o *mkp-1*, que se induce rápidamente después de la exposición a factores de crecimiento, a estrés oxidativo, o a proteínas de shock térmico (HSP) (Noguchi y cols., 1993). Las DSP, además de su especificidad por las distintas MAPK (ver tabla 2), difieren en su localización tisular. Así por ejemplo PAC1 es muy abundante en células hematopoyéticas, hVH-5 en cerebro, MKP 4 se detecta sólo en placenta e hígado embrionario, y MKP-5 sólo en hígado y músculo esquelético (Camps y cols., 2000). También presentan distinta localización subcelular: la MKP-1, PAC-1, hVH2 o MKP-2 y la hVH3 o B23 se localizan en el núcleo, mientras que la PYST1 o MKP-3 aparece exclusivamente en el citosol (Camps y cols., 2000). La MKP-4 puede aparecer tanto en el citosol como en el núcleo.

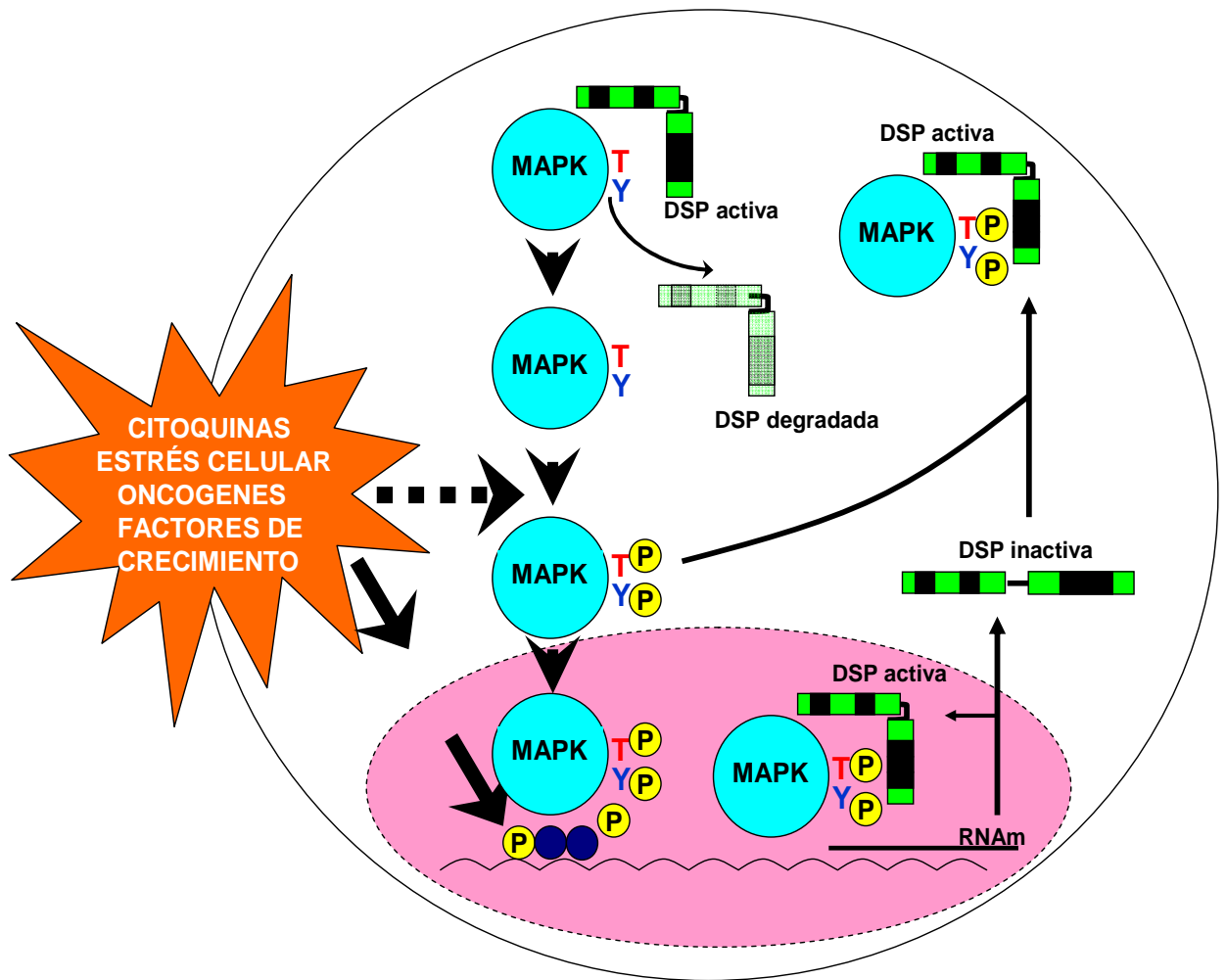
INTRODUCCIÓN

Figura 21.- Clases y dominios de las tirosín fosfatases.



INTRODUCCIÓN

Figura 22.- Regulación de las MAPK por las DSPs.



INTRODUCCIÓN

Tabla-2 Especificidad de las MKPs por las MAPK (Owens y Keyse, 2007).

Gen	MKP	Otros nombres	Localización cromosómica	Localización subcelular	Sustrato preferente	Funciones Fisiológicas
DUSP1	MKP-1	CL100, erp, 3CH134, hVH1	5q34	Nuclear	JNK, p38, ERK	Regula negativamente la función inmune. Protege los ratones del shock endotóxico letal. Juega un papel clave en la homeostasis y media la resistencia al estrés celular en fibroblastos de ratón.
DUSP4	MKP-2	Typ1, Sty8, hVH2	8p12-p11	Nuclear	JNK, p38, ERK	
DUSP2		PAC-1	2q11	Nuclear	ERK, p38	Regula positivamente la respuesta inflamatoria. Ratones knock out son resistentes a la inflamación.
DUSP5		hVH-3, B23	10q25	Nuclear	ERK	
DUSP6	MKP-3	Pyst1, rVH6	12q22-q23	Citoplasmática	ERK	Regula Negativamente la cascada de ERK por debajo FGFR.
DUSP7	MKP-X	Pyst2, B59	3p21	Cytoplasmic	ERK	
DUSP9	MKP-4	Pyst3	Xq28	Citoplasmática	ERK > p38	Esencial para el desarrollo y función de la placenta.
DUSP8		M3/6, hVH5, HB5	11p15.5	Citoplasmática /nuclear	JNK, p38	
DUSP10	MKP-5		1q41	Citoplasmática /nuclear	JNK, p38	Funciones en la respuesta inmune innata y adaptativa.
DUSP16	MKP-7		12p12	Citoplasmática /nuclear	JNK, p38	

INTRODUCCIÓN

4.3. Papel de las MAP quinasas y fosfatasas en la pancreatitis aguda.

Entre otros estímulos, la activación de las tres principales MAPK (ERK 1/2, JNK y P38) puede inducirse por ROS (Dabrowski y cols., 2000), o por diferentes secretagogos como la bombesina, el carbacol, o la colecistoquinina (CCK), (Dabrowski y cols., 1996; Duan y cols., 1995; Schafer y cols., 1998; Williams y cols., 2002; Sans y cols., 2004). El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) también activa ERK y p38, pero no JNK (Simeone y cols., 2001).

En la pancreatitis aguda inducida por ceruleína, análogo de la CCK, se ha descrito una activación de todas las MAP quinasas, siendo especialmente rápida e intensa la activación de p38. Existe activación basal de p38 y de ERK, pero no de JNK que se activa con dosis mayores de ceruleína y más tenuemente (Wagner y cols., 1999). Incluso se ha llegado a proponer a JNK como marcador de pancreatitis inducida por hiperestimulación del páncreas (Grady y cols., 1996).

También nuestro grupo ha observado la activación de las tres MAPK en el modelo de pancreatitis aguda necrótica, inducida por taurocolato sódico 3,5% (Pereda y cols., 2004).

En la patología pulmonar asociada a la pancreatitis, se ha demostrado que p38 tiene un papel importante en la inducción de TNF- α y en el daño pulmonar. Así, tras la administración de CNI-1493 (inhibidor de la activación de macrófagos) a los animales con pancreatitis inducida por infusión retrógrada de sales biliares se inhibe la fosforilación de p38 y la secreción de TNF- α en pulmón. Ambos efectos se acompañan de un menor daño pulmonar y de un menor infiltrado inflamatorio (Yang y cols., 1999).

Hasta principios de esta década, se prestaba atención a la activación de las MAPK en el páncreas y en la pancreatitis, pero sin tener en cuenta su regulación por las fosfatasas. El grupo de Wagner fue de los primeros que estudiaron el papel de las MKPs durante la pancreatitis aguda utilizando el modelo de ceruleína. Observaron que MKP-1, MKP-3 y

INTRODUCCIÓN

de MKP-5 eran codificadas por genes de respuesta temprana y su expresión cambiaba de nula a muy elevada de manera muy rápida en la pancreatitis aguda. Utilizando un inhibidor de MKP-1 se aumentó la actividad de JNK pero no de p38 ni de ERK, demostrando así la inhibición que MKP-1 realiza sobre JNK (Höfken y cols., 2000). No obstante, a pesar de que las MKPs actúan específicamente sobre las MAPKs, no son las únicas fosfatasas que actúan inhibiendo a las MAPK, ya que tanto PPPs como PTPs han sido relacionadas con la regulación de MAPK. Así por ejemplo, está descrito que PP1 defosforila JNK (Brichese y cols., 2004) y que la HePTP y la PP2A defosforilan ERK 2 (Zhou y cols., 2002). También se ha publicado que la calcineurina regula ERK (Ikeda y cols., 2006) y p38 (Muroi y cols., 2004). Las MAPK, además, interaccionan con PTPs de membrana como CD45 (Arimura y cols., 2001).

El papel que juegan las fosfatasas en la pancreatitis es realmente complejo. La inhibición de la actividad de las PTPs participa en la formación del edema en el páncreas durante la PA (Schnekenburger y cols., 2005) y el bloqueo de CD45 parece mediar la inducción de TNF- α (De Dios y cols., 2006). Por otro lado, la estimulación de las MKPs y de las PTPs SHP-1 y SHP-2 ocurre tempranamente en el transcurso de la PA (Höfken y cols., 2000).

5. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA CASCADA INFLAMATORIA.

En los últimos tiempos, el conocimiento de los mecanismos moleculares epigenéticos de la regulación génica se ha erigido como un campo de investigación de gran potencial cuyo desarrollo puede conducir a la aparición de nuevas estrategias terapéuticas para paliar ciertos procesos patológicos.

La epigenética estudia los cambios reversibles en el ADN o las histonas que no afectan la secuencia nucleotídica de un gen, pero

INTRODUCCIÓN

producen cambios en su expresión. Incluye todos aquellos grupos químicos (metil, acetil o fosfato) o proteínas (ubiquitina o SUMO) que se unen al ADN o a las histonas, dando lugar a metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones y sumoilaciones. Estas modificaciones en el ADN o en las histonas intervienen en procesos importantes como la diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la inestabilidad genómica y el cáncer. Los principales mecanismos de regulación epigenética son la metilación del ADN, la modificación de las colas N-terminal de las histonas (el denominado código de histonas) y la remodelación de la estructura de la cromatina.

Las histonas son las proteínas responsables del empaquetamiento del ADN (juntos forman los nucleosomas) y componen alrededor de la mitad de la masa de la cromatina. Las histonas contienen una gran cantidad de residuos cargados positivamente (Arg y Lys) y se unen iónicamente a los grupos fosfato del ADN cargados negativamente. Las histonas participan en la activación génica controlando la accesibilidad al ADN.

Las modificaciones sufridas por las histonas son un proceso multifacético que juega un papel crítico y dinámico en la regulación de la expresión génica. Es un proceso dirigido por distintos complejos enzimáticos. La metilación de las histonas es llevada a cabo por las histona metiltransferasas (HMTs) en una reacción que usa S-adenosilmetionina como sustrato (SAM) y produce S-adenosilhomocisteína (SAH), relacionando al GSH con el control de modificaciones epigenéticas al ser un factor limitante en la disponibilidad de SAM (Hitchler y Domann, 2007). La acetilación de las histonas es realizada por las histona acetil transferasas (HATs) y es dependiente de la acetil Coenzima A (AcCoA). Ambos tipos de modificaciones pueden ser revertidas por las histona dimetilasas (HDMTs) y las histona deacetilasas (HDACs) respectivamente (Hitchler y Domann, 2007).

La acetilación de histonas suele ocurrir en residuos de lisina de las histonas H3 y H4 y está asociada generalmente a la activación génica, mientras que la deacetilación ocasionada por las HDACs suele originar el silenciamiento génico. Por ejemplo, los genes que aparecen

INTRODUCCIÓN

transcripcionalmente activos suelen tener en sus regiones reguladoras una abundante acetilación de la histona H3 en su lisina número 9 (H3K9ac) como señal activadora de la transcripción, aunque muchos otros residuos están asimismo implicados en la regulación de la transcripción (Hitchler y Domann, 2007).

Las HMTs pueden metilar lisinas y argininas de las colas de histonas y pueden causar tanto activación como represión génica, dependiendo de los residuos aminoacídicos metilados. Así, la metilación de la lisina número 4 de la H3 (H3K4me) está asociada con la activación transcripcional, mientras que la metilación de la lisina 9 de la H3 (H3K9me) está asociada con un efecto represor (Hitchler y Domann, 2007).

Estos complejos enzimáticos también actúan en conjunto, cooperando en el silenciamiento o en la activación de la expresión génica. Por ejemplo, las HDACs pueden eliminar grupos acetilos de la H3K9 facilitando su metilación por HMTs para iniciar la formación de la heterocromatina y la inhibición de la transcripción génica (Hitchler y Domann, 2007).

Hasta la fecha, no se han llevado a cabo demasiados trabajos sobre los procesos epigenéticos que acontecen en la pancreatitis aguda. En 2007, nuestro grupo de investigación estudió el complejo y ordenado perfil temporal de expresión de los genes proinflamatorios más importantes relacionados en el inicio de la PA inducida por taurocolato en ratas (Sandoval y cols., 2007). Se analizaron mecanismos epigenéticos de regulación en tres genes modelo, *egr-1*, factor de transcripción de respuesta temprana a factores de estrés y citoquinas (Chen y cols., 2003), el factor de adhesión molecular 1 (*icam-1*), que es un gen de respuesta tardía, y *tnf- α* . Se observó la intervención de diferentes factores de transcripción proinflamatorios (ATF-2, NF- κ B, C/EBP β o SP1), la unión de los complejos HAT (CBP), la liberación de complejos HDAC (SIN3A-HDAC1-HDAC2) y la modificación de residuos específicos de histonas (H3K9ac, H3K14ac, H4K5ac y H3K4me3) (Sandoval y cols., 2007). Además se puso de manifiesto que *egr1* es rápidamente sobreexpresado en páncreas; su ARNm aumenta más de 20 veces por análisis de RT-PCR, después de la inducción de la pancreatitis y que los niveles de expresión de su ARNm

INTRODUCCIÓN

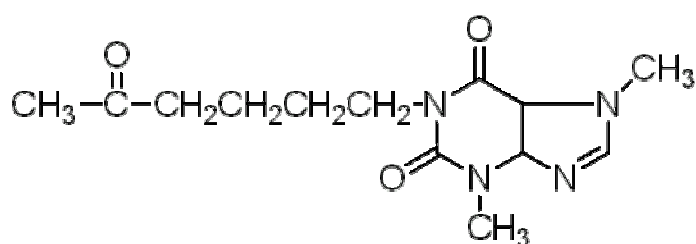
aumentan mucho menos en ratas con PA necrótica tratadas con pentoxifilina. Lo mismo ocurría con la expresión de los genes tardíos *icam-1* e *inos-2*, su ARNm se incrementaba marcadamente con el transcurso de la pancreatitis y los niveles de sus ARNm prácticamente no aumentaban con el tratamiento con pentoxifilina (Sandoval y cols., 2007).

6. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA MEDIANTE PENTOXIFILINA.

La pentoxifilina es un fármaco vasodilatador que relaja los vasos sanguíneos e impide la agregación plaquetaria, ya que aumenta y potencia el efecto de las prostaciclina (Schermyly y cols., 2001) y reduce la viscosidad de la sangre, facilitando la circulación de la sangre por los tejidos (Gül y cols., 2008). Terapéuticamente se administra para tratar procesos isquémicos como accidentes cerebrovasculares o trastornos de la vascularidad periférica (Frampton y cols., 1995). Fue el primer fármaco aprobado en EE.UU. para el tratamiento de la enfermedad arterial periférica oclusiva (Spittel y cols, 1985).

Estructuralmente, la pentoxifilina es un alcaloide purínico derivado de la metilxantina (figura 22) y desde hace tiempo se conocen algunos de sus efectos, como la inhibición de la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-2 (Zabel y cols., 1993) y la actividad fosfodiesterasa (Coimbra y cols., 2004).

Figura 23.- Estructura de la Pentoxifilina.



INTRODUCCIÓN

Como consecuencia de la inhibición en la producción de citoquinas, la pentoxifilina también previene el aumento de la adhesión leucocitaria y disminuye la formación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Gül y cols., 2008), por lo que es considerada como un agente anti-inflamatorio. También mejora procesos hemorrágicos y sepsis (De Campos y cols., 2008) y se ha descrito que disminuye la mortalidad en la sepsis neonatal (Haque y Mohan, 2003).

En cuanto a la pancreatitis aguda, el fracaso con los tratamientos previos dirigidos a inactivar la autodigestión pancreática y la implicación de una respuesta exagerada e incontrolada del sistema inmunológico, con una excesiva activación de los neutrófilos y una intensa producción de citoquinas proinflamatorias, dieron lugar a nuevas estrategias en el tratamiento de esta enfermedad intentando controlar el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica que se produce en el contexto de la PA grave.

Siguiendo esta hipótesis, se han probado múltiples antioxidantes como n-acetilcisteína, selenio y vitamina C y aunque hay numerosas evidencias que indican una disminución de los niveles sanguíneos de antioxidantes durante la pancreatitis y que la suplementación con antioxidantes puede prevenir esa disminución, clínica y experimentalmente no se han observado beneficios considerables en la disfunción orgánica o en la muerte por PA (Johnson, 2007).

También se ha intentado el tratamiento de la PA con anticuerpos específicos para citoquinas proinflamatorias (Norman y cols., 1996; Dinarello y cols., 1993; Osman y cols., 1998¹), el fusidato sódico (Osman y cols., 1998²), con inmunomoduladores no específicos (como corticoides o el levamisol) (Gloor y cols., 2001 Widdison y cols., 1992), y con el uso de antagonistas de PAF (como BB-82 y lexipafant) (Formela y cols., 1994; Kuby, 1994), entre otros.

Las propiedades anti-inflamatorias de la pentoxifilina se llevan probando en modelos animales de pancreatitis aguda desde hace dos décadas (Lupal'tsev, 1988) y en muchos trabajos se ha visto que tiene efectos beneficiosos, tanto en la pancreatitis aguda edematosa, como en la

INTRODUCCIÓN

necrótica (Zaporozhchenko, 2005; De Campos y cols., 2008; Eşrefoğlu y cols, 2008; Gül y cols., 2008), aunque el consenso entre los investigadores no es completo (Bassi y cols., 1994).

Nuestro grupo de investigación también lleva utilizando la pentoxifilina desde hace tiempo *in vivo* en los modelos de PA severa inducida por taurocolato y en la PA leve inducida por ceruleína. En el año 2000, describimos que en la PA inducida por ceruleína la pentoxifilina reducía el edema intersticial, el infiltrado inflamatorio y la producción de TNF- α , evitaba el aumento de NO y producía una prevención parcial en la depleción de GSH (Gomez-Cambronero y cols., 2000). La pentoxifilina también producía la disminución de TNF- α y su receptor soluble TNFR1 (Granell y cols, 2004).

En un estudio posterior confirmamos el efecto de la pentoxifilina sobre el TNF- α en el modelo de PA inducida por taurocolato y observamos que disminuía la ascitis de forma paralela a la disminución de la infiltración polimorfonuclear y de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en pulmón. El oxipurinol también disminuía el infiltrado polimorfonuclear y la actividad de la MPO. Ambos tratamientos reducían la fosforilación de las MAPK, la pentoxifilina actuaba sobre ERK y JNK, y el oxipurinol sobre p38 (Pereda y cols., 2004).

En el mismo trabajo describimos que la administración conjunta del oxipurinol y de la pentoxifilina tenía efectos mayores que cuando se administraban por separado sobre el infiltrado inflamatorio y la ascitis, e histológicamente provocaba gran reducción de la inflamación y el daño tisular. El co-tratamiento también reducía significativamente la mortalidad. Estos efectos beneficiosos del co-tratamiento se atribuyeron a la inhibición simultánea de las tres MAPK (Pereda y cols., 2004).

II-OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos que planteamos en la presente Tesis Doctoral, atendiendo a los antecedentes del tema de investigación han sido los siguientes:

- 1. Estudiar los mecanismos moleculares implicados en la depleción de glutatión en la pancreatitis aguda.**
 - 1.1. Estudiar el papel de la glutamato cisteína ligasa en la depleción de glutatión en páncreas durante la pancreatitis aguda.**
 - 1.2. Investigar la degradación del glutatión en páncreas en el curso de la pancreatitis aguda y las enzimas implicadas en el proceso.**

- 2. Estudiar los mecanismos moleculares implicados en la inducción de la cascada inflamatoria en la pancreatitis aguda.**
 - 2.1. Determinar los cambios en la actividad de las proteínas fosfatasa en páncreas durante la pancreatitis aguda.**
 - 2.2. Determinar el mecanismo implicado en la modulación de la cascada inflamatoria en la pancreatitis aguda mediante la pentoxifilina.**

III-MATERIALES Y
MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

1.1. Animales de experimentación.

Los animales de experimentación utilizados fueron ratas Wistar macho jóvenes de 250 a 350 g de peso corporal para la pancreatitis aguda necrótica experimental inducida con taurocolato y para la pancreatitis edematosa inducida con ceruleína.

Los animales se mantuvieron en el animalario bien de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina o en el de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València, 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 (Letica, 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. 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 (1999) y fueron aprobadas por la comisión de Ética de experimentación Animal de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

La administración del tratamiento con pentoxifilina se realizó inmediatamente después de la inducción de la pancreatitis aguda necrótica y con una concentración de 12 mg/kg por vía femoral.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.2. Aparatos.

- Pipetas de 1000, 200, 20, 10, 5 y 2 ml de la marca GILSON.
- Balanzas de precisión SARTORIUS, modelo TECATOR 6110 y modelo PT 1200.
- Centrífuga refrigerada marca HETTICH, modelo Rotina 420R y Ultracentrífuga Beckman, modelo OptiMax (130.000 r.p.m).
- Espectrofotómetro KONTRON modelo Uvikon 810 con baño termostatzado.
- Agitador magnético Selecta, modelo Agimatic-S.
- Agitador orbital marca Stuart modelo Rocket SSL3.
- pHmetro marca CRISON, modelo Microph 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.
- Baño termostatzado provisto de agitación automática regulable, marca SBS modelo BT.
- Homogeneizador marca Heidolph, modelo RZR 2021.
- Autoclave Selecta, modelo Autester-G.
- Sonicador modelo Vibra-Cell VCX-500 sonicator.
- Cubetas de electroforesis y electrotransferencia de 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.
- Captador de imágenes Fujifilm-FLA 300.
- Aparato de PCR semicuantitativa Techne modelo TC-312.
- Ultracongelador NewBrunswick modelo SC-420.
- Transiluminador de ultravioleta.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Campana de flujo laminar vertical CULTAIR modelo B100.
- Estufa termostaticada de cultivos NAPCO modelo 5415IR, CO2 System.
- Bomba de perfusión la marca Harvard Instruments Modelo Pump 11.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) compuesto por:
 - 2 bombas marca WATERS modelo 510.
 - Un inyector PHARMACIA LKB, modelo 2157.
 - Detector UV WATERS, modelo 441, a longitud de onda constante de 365 nm.
 - Ordenador IBM XT modelo 286 con integrador y que controla el equipo.
 - Columna cromatográfica WATERS modelo Spherisorb aminada, de dimensiones 20 X 0.46 cm y 5 μ m de diámetro de partícula.
- MALDI-TOF de de los servicios de proteómica del Centro de investigación Príncipe Felipe (*4700 Proteomics Analyzer* de Applied Biosystems) y del servicio de proteómica de la Universidad de Valencia (*Reflex IV* de Bruker).

1.3. Reactivos.

- Anestésias: Ketamina (Imalgene 500), Acepromicina (Calmoneosan).
- Taurocolato sódico y ceruleína, glutatión reducido, glutamato, cisteína, γ -glutamilo glutamilo (Sigma Aldrich Química).
- Pentoxifilina (Hemovás ampollas 300 mg, adquisición en farmacia).
- Células AR42J (European Collection of Cell Cultures).

MATERIALES Y MÉTODOS

- Placas petri, tubos de plástico de 50 y 15 ml, rascador cell scraper (Corning), filtros de jeringa de nylon 0,45 μ (Nalgene).
- Medio de cultivo “Dubelcco’s Eagle Modified” sin glutamina, PBS, glutamina, estreptomycin/penicilina, suero bovino fetal (Gibco).
- Lowry Protein Assay Kit (Sigma Aldrich Química).
- MTT (Calbiochem).
- DMSO, BSO (Sigma Aldrich Química).
- Inhibidores de proteasas: Cóctel de inhibidores de proteasas, Leupeptina, Bestatina, aprotinina, E64, pepstatina A y AEBSF (Sigma Aldrich Química).
- ADN- λ , Betaína, ácido deoxicólico (Sigma Aldrich Química), proteína A, proteína G, proteínasa K (Amersham), marcador molecular de DNA p100 (Pharma Biotech).
- Enzimas: TaqPolimerasa (Boehringer Mannheim); Glutación-S-transferasa, Carboxipeptidada B, Ribonucleasa A, Tripsina (SIGMA Aldrich Química), ERK 1/2 fosforilado (Bionova).
- Primers: Primers para los promotores de la GCL catalítica y reguladora, de egr1, inos-2, icam-1 y tnf- α (Thermo Scientific).
- Kit de purificación de ADN (Qiagen).
- Kit de purificación de proteínas afines al GSH: Bug Búster GST Bind Kit (Novagen).
- Kit de purificación de proteínas afines a la biotina: Immobilized monomeric Avidin Kit (Thermo Scientific).
- Biotina: N-hydroxysuccinimidobiotina (Thermo Scientific)
- Soporte de sílice para Capa fina (Sigma-Aldrich).
- Kit de cromatografía de exclusión: D-SaltTM Dextran Desalting Columns (Thermo Scientific).

MATERIALES Y MÉTODOS

- Kit de cuantificación de Biotina: No-Weigh™ HABA/Avidin Premix (Thermo Scientific).
- Kits de actividad fosfatasa: Serine/threonine Phosphatase Assay System y Tyrosine Phosphatase Assay System (Promega).
- Kit para medir concentración de AMPc: Cyclic AMP EIA (Cayman Chemical).
- Acrilamida, TEMED, persulfato amónico (APS), dodecilsulfato sódico (SDS), DL-Ditiotreitol (DTT), albumina de suero fetal (BSA) (Sigma-Aldrich Química), β-mercaptoetanol, dual color protein molecular Marker (Biorad).
- Membranas de transferencia de nitrocelulosa 0,45 μ (Schleicher & Schuell Bioscience).
- Anticuerpos frente a: C-MYC (Abcam), MEK 1/2 fosforilado y ERK 1/2 fosforilado (Cell signaling), GCL (NeoMarkers), C-MYC fosforilado, mSIN3A, HDAC1, CBP, PCAF, α-tubulina, RNA polimerasa II, antimouse monoclonal (Santa-Cruz).
- Kit de revelado de western blot: Phototope™ HRP Detection kit (Cell Signaling Technology).
- Radiografías X-OMAT, líquido de revelado, líquido fijador (Kodak).
- Inhibidores de fosfatasas: Cóctel de inhibidores de fosfatasas I y II, Ortovanadato sódico, Pirofosfato sódico y fluoruro sódico (Sigma Aldrich Química).
- Sustratos: Hipuril-Arginina, 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno, 4-p-nitroanilida, ARN (tourula Yeast), glicil-glicina (Sigma Aldrich Química).
- El resto de reactivos y material fungible se obtuvo de los siguientes laboratorios: Bromatos, Afora, Greiner Bio-one, Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Molecular Probes, Panreac, Merck Biochemica (Alemania), Biorad, Amersham, Poch, BRL Life Technologies (USA) y Calbiochem (Alemania).

2. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN.

2.1. Modelo experimental de pancreatitis aguda necrótica *in vivo* en ratas.

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 taurocolato, 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 (activando las proteasas dependientes de 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., 2005).

Tras anestesiarse al animal, la inducción de la PA se lleva a cabo bajo medidas de asepsia (rasurado y pincelado de los animales con povidona yodada) (figura 23B), 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 23C). Después de clampar dicho conducto a su salida del hígado, para evitar su perfusión (figura 23D), se comienza la perfusión de taurocolato al 3,5% a un ritmo de 0.1 ml/100 g de peso del animal durante un minuto (figura 23E) utilizando una bomba de perfusión (Harvard Instruments, véase figura 24A). 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 modelo de pancreatitis aguda necrótica experimental inducida por taurocolato, la severidad y la mortalidad dependen de la concentración

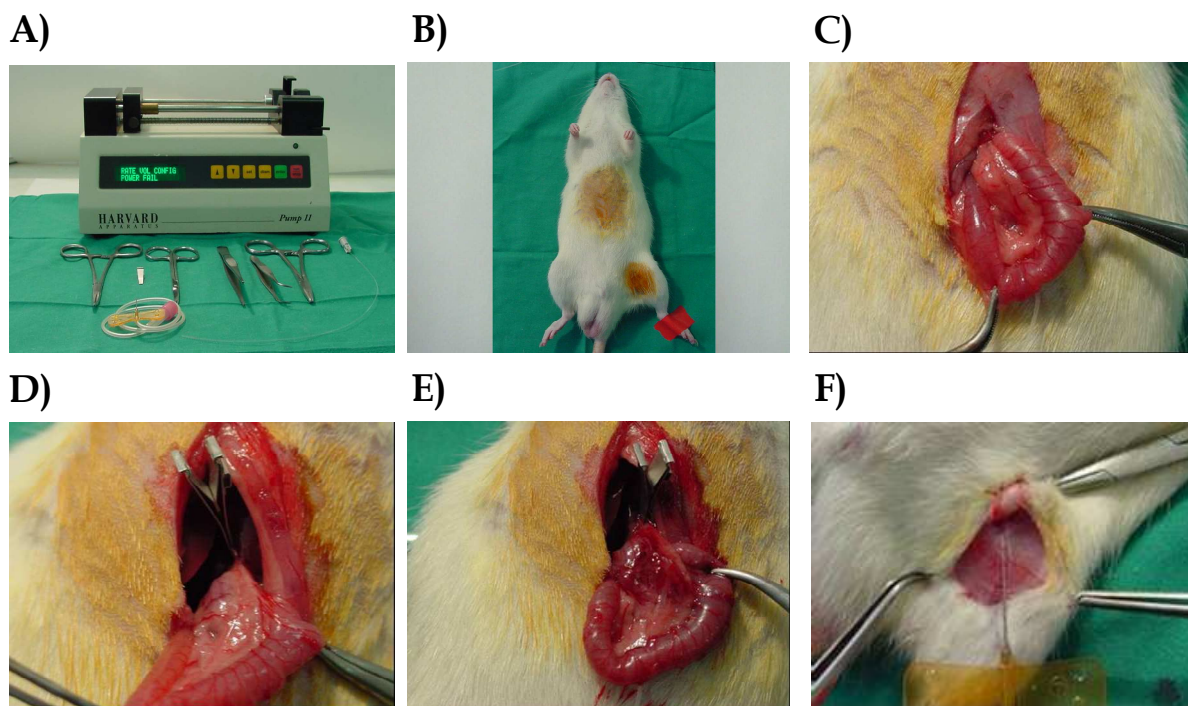
MATERIALES Y MÉTODOS

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.

En el grupo de animales tratados con pentoxifilina, ésta se administró mediante perfusión intravenosa en la vena femoral (figura 23F) inmediatamente después de la inducción con taurocolato, a una dosis de 12 mg/kg de peso del animal y a un ritmo de 66 μ l/min durante 30 min. En el grupo control se administró suero fisiológico (NaCl al 0,9 %) en la vena femoral a un ritmo de 66 μ l/min durante 30 minutos para comparar con el grupo tratado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 24.- Modelo de pancreatitis necrótica inducida por taurocolato. Material necesario (A), Preparación del animal (B), Cánula insertada en el conducto biliopancreático (C), Clampaje proximal del conducto biliopancreático (D), aparición de zonas necróticas en el páncreas (E) y cánula insertada en la vena femoral para la administración de la pentoxifilina (F).



2.2. Modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína *in vivo* en ratas.

Los estudios de la pancreatitis aguda edematosa se llevaron a cabo en ratas utilizando un modelo 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 inyecciones intraperitoneales a intervalos horarios de una solución de ceruleína en

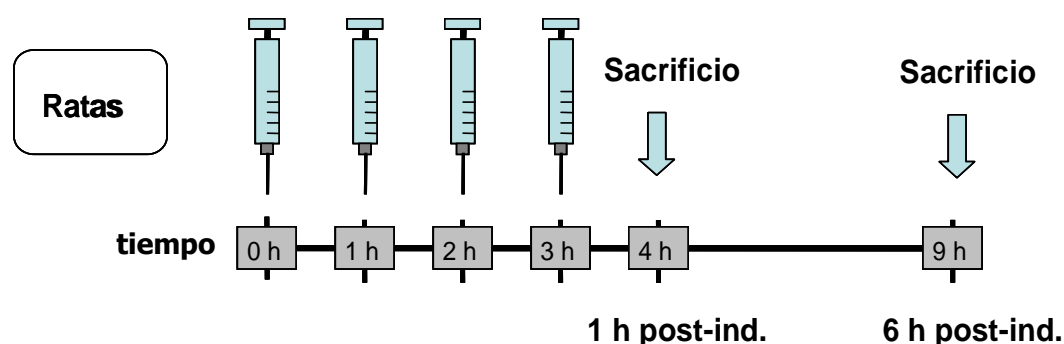
MATERIALES Y MÉTODOS

cloruro sódico al 0,9%. La dosis de cada inyección 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 optimizar el proceso, se prepara una solución stock de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de solución fisiológica que se almacena a -20°C . La solución de trabajo se debe preparar fresca en cada inyección.

Los sacrificios se realizan tras anestesiarse a las ratas, 1 h después de la última administración (figura 28).

Figura 25.- Esquema de la inducción de pancreatitis con ceruleína en ratas.



2.3. Modelo de cultivo de células AR42J *in vitro*.

En nuestro estudio *in vitro*, hemos empleado 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 rata. Es la línea celular que más se acerca *in vitro* a las células acinares del páncreas exocrino *in vivo*.

Las células AR42J se cultivan según indicaciones de la European Collection of Cell Cultures (ECACC).

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

MATERIALES Y MÉTODOS

- Dulbecco's Modified Eagle Medium sin glutamina (GIBCO), pH 7.4, al cual se le añaden los siguientes compuestos:
 - o Glutamina 2 mM
 - o Suero bovino fetal 10%
 - o Estreptomina 100 µg/ml
 - o Penicilina 100 µg/ml
 - o 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 gran número de células.

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 renueva de dos a tres veces por semana para las células de mantenimiento.

Para la realización de incubaciones de los distintos experimentos fueron empleadas placas petri de 21 cm² (Corning). Se prepara un volumen total de 4 ml por placa y se siembran 500.000 células en total.

Se dejan crecer las células sembradas hasta alcanzar un 80%-90% de confluencia que corresponde a unos 4 días tras la siembra, cambiando el medio de cultivo 12 h antes del experimento. Tras el periodo de incubación con los distintos tratamientos, las placas se lavan con 1 ml de PBS frío, retirando con precaución el PBS y se procede a la recogida de las células mediante rascador *cell scraper* (Corning) una vez añadido el tampón de lisis o de resuspensión correspondiente. En el caso del MTT, no se deben lavar las células en ningún caso.

Se utilizaron concentraciones de pentoxifilina 12 mg/L y dibutiryl AMPc 0,5 mM para los experimentos *in vitro*.

3. MÉTODOS.

3.1. Determinación de proteínas.

La determinación total de proteínas en las muestras se realizó por 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. La sensibilidad de este método permite detectar hasta 2 µg de proteínas.

3.1.1. Procedimiento.

Se añadió una cantidad de muestra comprendida entre 5 y 25 µl y se completó con agua hasta 1 ml. Para la correcta determinación de proteínas, se prepara una recta patrón construida con seroalbúmina bovina a concentraciones comprendidas entre 0,1 y 10 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 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 500 µl 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.

3.1.2. Cálculos.

Se resta a cada muestra la absorbancia del blanco. Las absorbancias obtenidas se interpolan en la recta construida con los

MATERIALES Y MÉTODOS

patrones. El valor hallado se expresa como miligramos de proteína por mililitro de muestra (mg/ml).

3.2. Determinación de glutatión reducido.

Para medir el glutatión reducido se ha utilizado el método descrito por Brigelius y colaboradores (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.



3.2.1. Procesado de las muestras.

Para la determinación de GSH en páncreas, se utiliza una cantidad de tejido de 80-120 mg y se resuspende en ácido perclórico al 6% + EDTA 1 mM (1 ml por cada 100 mg de tejido). Se homogeniza la muestra (debe mantenerse siempre en frío) y se centrifuga a 10.000 xg a 4°C durante 15 min.

La determinación del GSH se realiza en el sobrenadante. Al precipitado se le añade 1 ml de NaOH 0,1 M y se calienta a 50°C durante 12 horas, se agita para resuspenderlo y en él se determinará la concentración de proteínas en la muestra.

3.2.2. Procedimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

En una microcubeta se añaden los siguientes reactivos:

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

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 alrededor de 6 h en tampón fosfato cambiando el tampón de diálisis aproximadamente cada dos 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.

3.2.3. Cálculos.

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

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

Los valores se expresan en nmol/mg prot.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.3. *Western blotting.*

El *western blotting* es una técnica de biología molecular que combina 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.

3.3.1. **Procesado de las muestras.**

La preparación de las muestras para los experimentos dependió del origen de las mismas.

En el caso de los *western blots* que se realizaron a partir de tejido pancreático congelado, el tampón de homogenización que se utilizó fue el siguiente:

o Tris	10 mM
o Sacarosa	250 mM
o EDTA	5 mM
o NaCL	50 mM
o NaF	50 mM
o Pirofosfato sódico	30 mM
o Ortovanadato sódico	100 μ M
o DTT	1 mM
o Cóctel de inhibidores de proteasas	5 μ l/ml

Se utilizó 1 ml de tampón por cada 100 mg de tejido.

Cuando los *western blots* se realizaron a partir de células, el tampón de lisis llevaba la siguiente composición:

MATERIALES Y MÉTODOS

- o Tris 75 mM, pH 6,8
- o Glicerol 11%
- o SDS 2,2%

En el día del experimento se añade al tampón

- o Ortovanadato sódico 100 μ M
- o Cóctel de inhibidores de proteasas 5 μ l/ml
- o β -mercaptoetanol 0,3%
- o Azul de bromofenol 2%

Se añaden 250 μ l del tampón de lisis celular por cada placa Petri de 21 cm. Se incuba 5 min en hielo y se recoge el lisado con un *cell scraper*.

El procesado de las muestras, tanto de tejido como de células, se realizó siempre en frío y una vez homogeneizadas se centrifugaron a 9000 *xg*, recogiendo el sobrenadante para la determinación de proteínas.

3.3.2. Electroforesis.

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

Se cargan las muestras y un patrón de pesos moleculares (biorad) en geles discontinuos, con una zona de *staging* de baja concentración de acrilamida y una zona de *running* de alta concentración de acrilamida. El *staging* tiene un porcentaje de acrilamida menor, facilitando la entrada y la compactación de las muestras en el gel. El *running* se compone de

MATERIALES Y MÉTODOS

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 (Tris 25 mM, glicina 200 mM, SDS 0,1%, pH 8,3).

3.3.3. Electrotransferencia.

Para la exposición de las proteínas a los anticuerpos para su detección, una vez migradas en el gel de poliacrilamida, se realiza una electrotransferencia de las proteínas. Se trata de poner el gel de acrilamida 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.

La electrotransferencia se realizó en condiciones húmedas por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad) utilizando membranas de nitrocelulosa (Schelicher & Schuell, USA).

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

3.3.4. 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 hidrógeno conjuntamente con un agente comercial denominado Lumiglo R (Amersham). 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.

Las condiciones de la inmunoquimioluminiscencia fueron:

MATERIALES Y MÉTODOS

- 1.- Incubación de 60 min a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% de leche desnatada en polvo (o albumina de suero bovino) en TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,6 + Tween-20 0,1%).
- 2.- 3 lavados de 5 min con 15 ml de TBS-T.
- 3.- Las membranas se incubaron el tiempo que determina el anticuerpo primario empleado (véase 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 (véase tabla 3).
- 4.- 3 lavados de 5 min con 15 ml de TBS-T.
- 5.- Incubación de las membranas durante 60 min con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti-IgG de conejo, (Cell Signaling) disuelto en tampón de bloqueo (1:2000) y para la tubulina se utilizó anticuerpo de ratón (Santa-cruz) disuelto en tampón de bloqueo (1:10000).
- 6.- Se realizan 3 lavados de 5 min con 15 ml de TBS-T.

3.3.5. Visualización.

La membrana se incuba 1 min con Lumiglo R y con peróxido de hidrógeno (ECL-system, Amersham) e inmediatamente se expone a autorradiografía con films de fotografía (KODAK X-OMAT).

La exposición de la radiografía se lleva a cabo en una habitación oscura y su revelado es como el de fotografía convencional: 1 min en líquido revelador (Kodak), se lava con agua, otro minuto en líquido fijador (Kodak), se lava y ya esta revelada la radiografía.

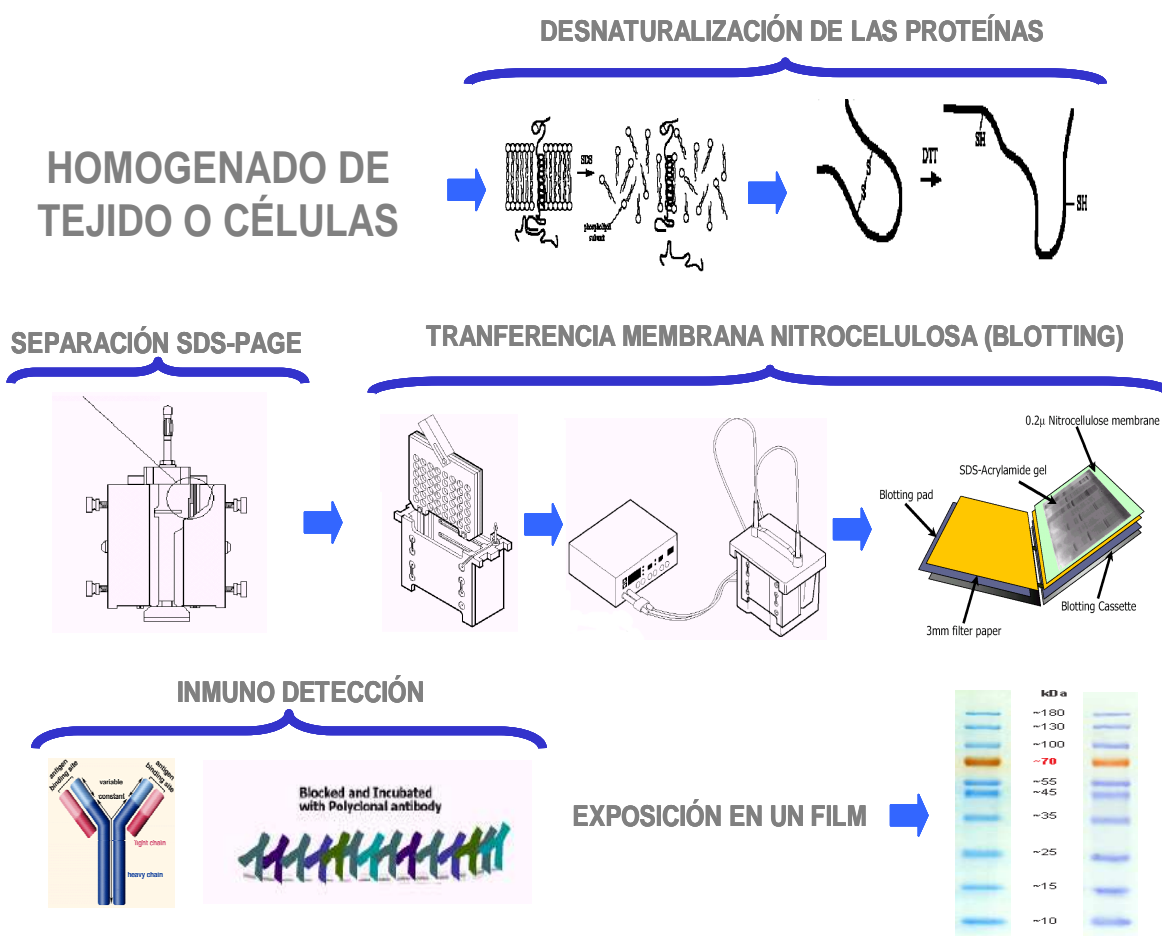
3.3.6. Cuantificación de los resultados.

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

MATERIALES Y MÉTODOS

El número de experimentos para cada western blotting aparece indicado en la leyenda de la figura correspondiente de los resultados.

Figura 26.- Esquema de la técnica del Western blotting.



MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.- Anticuerpos utilizados en los western blotting.

ANTICUERPO	DETECCIÓN	PRODUCTOR	MW	FUENTE	DIL.
Anti GCS	subunidad pesada (epitopo del aa 295 al 313)	Neo Markers	73 KDa	Conejo	1:500
Anti p-p44/42 ^{MAPK}	P44/42 fosforilada en Tr202 y Tir204	Cell Signaling	42-44KDa	Conejo	1:1000
Anti p-MEK1/2	MEK1/2 fosforilada en Ser 217/221	Cell Signaling	45 KDa	Conejo	1:1000
Anti C-MYC	Tr358	Abcam	49 KDa	Conejo	1:500
Anti pC-MYC	c-myc fosfolada en Tr58 y Ser 62	Abcam	49 KDa	Conejo	1:1000
Anti α -tubulina	subunidad alpha	St. Cruz Biotech.	45 KDa	Ratón	1:2000
Anti Rabbit-HRP	Detecta Ig G de conejo.	St. Cruz Biotech.		Ratón	1:10000
Anti Mouse-HRP	Detecta Ig G de ratón.	St. Cruz Biotech.		Cabra	1:2000

3.4. Inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP).

El método de inmunoprecipitación de cromatina empleado es una adaptación del protocolo descrito por Borrás y colaboradores en 2003 (Borrás y cols., 2003). 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 ADN de tamaño similar (que conservan unidos los factores de transcripción por los enlaces carbamida).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se inmunoprecipitan mediante anticuerpos específicos contra los factores de transcripción que se quieren estudiar (arrastrando el ADN al que estén unidos), y posteriormente se detecta la presencia o no del gen en el inmunoprecipitado por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos de los genes de interés. Si la PCR detecta el gen a estudiar, es porque existía unión del factor de transcripción correspondiente a dicho gen.

3.4.1. Procedimiento.

3.4.1.1. Preparación de núcleos en tejido pancreático de rata.

Esta técnica requiere la utilización de tejido fresco, así que se realizó la extracción de los páncreas de las ratas inmediatamente después del sacrificio. 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 125 mM. Las muestras se lavan dos veces con 10 ml de PBS y se resuspenden en 10 ml de PBS suplementado con 5 µl/ml de los cócteles de inhibidores de proteasas y de fosfatasa I y II (Sigma-Aldrich). El tejido se disgrega en un homogeneizador de hélice y la suspensión obtenida se filtra a través de una membrana de nylon de poro de 500 µm a un tubo corning y se centrifuga a 1.500 *xg* durante 5 min. Los sedimentos celulares son resuspendidos suavemente con pincel en tampón de lisis celular (HEPES 5 mM, KCl 85 mM, NP40 0.5%, pH 8,0) suplementado con 5 µl/ml de los cócteles de inhibidores de proteasas y de fosfatasa I y II y se incuban en hielo durante 15 min. Se centrifugan posteriormente a 3.500 *xg* durante 5 min para recoger los núcleos y los precipitados nucleares se resuspenden en 3 ml de tampón de lisis nuclear (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%, pH 8,1) y se almacenan a -20°C en alícuotas hasta su uso.

3.4.1.2. Fragmentación de la cromatina entrecruzada.

Para obtener los fragmentos de cromatina para la inmunoprecipitación, los núcleos lisados se someten a sonicación (Vibra-

MATERIALES Y MÉTODOS

Cell VCX-500 sonicator). Cada muestra fue sonicada con 5 ciclos de 10 s a 38% de amplitud con una sonda de 3 mm, siendo mantenidas en hielo durante 1 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 14.000 $\times g$ durante 10 min y transferidas a nuevos eppendorfs hasta eliminar cualquier rastro de residuos celulares. Una alícuota de 50 μ l se separa y se procesa para extracción y cuantificación de ADN, mientras que otra alícuota de 5 μ l se separa para la medida directa de la cromatina por OD260. La muestra restante que contiene los fragmentos de cromatina solubles se diluye 10 veces con tampón de dilución (SDS 0.01%, Triton X-100 1.1%, EDTA 1.2 mM, NaCl 167 mM, 5 μ l/ml de los cócteles de inhibidores de proteasas y de fosfatasa I y II, Tris-HCl 16,7 mM, pH 8) y finalmente son congeladas.

3.4.1.3. Cuantificación del ADN.

La alícuota de 50 μ l de cromatina se lleva a 500 μ l con TE (EDTA 1 mM, Tris-Cl 10 mM, pH 8), se le añaden 40 μ l/ml de RNasa A y se incuba a 65°C durante toda la noche, o como mínimo 6 h. 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 ADN 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 ADN se precipita añadiendo 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 5,2, y se incuba a -20°C durante toda la noche. Tras el lavado con etanol 70% y su secado, el ADN se resuspende en TE pH 8. El ADN correspondiente a cada fracción se disuelve en 400 μ L de tampón TE y su concentración se cuantifica en placa de 96 pocillos por el *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 de ADN λ diluido en un volumen final de 100 μ l de TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5) en cada pocillo. Por otro lado, se añaden 100 μ l de muestra por triplicado en diluciones de 1/5,

MATERIALES Y MÉTODOS

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 ADN λ se utilizó para calcular la concentración del ADN. La comparación entre las medidas de Absorbancia a 260 nm (cromatina) y de Pico Green (ADN) indica que aproximadamente 1 unidad de absorbancia corresponde a 50 μ g de ADN.

3.4.1.4. Inmunoprecipitación de la cromatina.

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

A la proteína A+G-sefarosa se le añade ADN λ , ARNt y proteína BSA para bloquear sus sitios inespecíficos de unión a la cromatina. A continuación la muestra de cromatina se pre-lava con esta proteína A+G (previamente bloqueada).

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 μ g/ml de ADN λ sonificado, BSA 10 μ g/ml y ARNt 250 μ g/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 en una plataforma rotatoria, y posteriormente se centrifugan a 14.000 xg 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 μ g de los anticuerpos enumerados en la tabla 4. Como control negativo de la inmunoprecipitación se procesa una alícuota en paralelo en ausencia de anticuerpo (No Ab), y el sobrenadante de dicha muestra constituye la fracción no-unida a la

MATERIALES Y MÉTODOS

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 añaden 50 µl de proteína A+G-sefarosa previamente bloqueada como se comentó anteriormente, y se incuban a 4°C durante 4 h en rotación. Tras ello, todas las muestras se centrifugan a 14.000 *xg* 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 No Ab 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 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, ácido deoxicólico 0,5 %, SDS 0,1%, NP-40 1%, EDTA 1 mM), dos veces con tampón de alta salinidad (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, ácido deoxicólico 0,5 %, SDS 0,1%, NP-40 1%, EDTA 1mM), posteriormente dos veces con tampón de LiCl (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1mM, LiCl 250 mM, NP-40 1%, ácido deoxicólico 0.5 %) y finalmente dos veces con tampón TE pH 8 (Tris 10 mM, EDTA 0,25 mM). La fracción de cromatina unida a la proteína A+G-sefarosa fue resuspendida por tratamiento 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 ADN. Al día siguiente, se digieren las muestras con proteínasa K (10 µl/ml) durante 1 h y finalmente el ADN de las fracciones (Input, inmunoprecipitado (IP) y No ab) se purifica con el *PCR purification kit* (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN 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.

3.4.1.5. Análisis por PCR del ADN inmunoprecipitado.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas en las PCRs se representan en la tabla 6. La amplificación por PCR se realizó en un volumen de reacción de 20 µl con 2 µl de molde de ADN, 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.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el análisis de los productos de PCR, se mezclan 5 μ l de cada muestra con 1 μ l de tampón de carga 6X y se carga en un gel de agarosa del 1,8 %. La electroforesis se realizó en un tampón de TBE 0,5X, utilizando el patrón de pesos moleculares P100 *ladder* (Pharmacia Biotech). El gel se fotografía en un transiluminador de ultravioleta.

Tabla 4.- Anticuerpos utilizados en los ensayos de ChIP.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	μg FINALES
Anti C-MYC	Santa cruz	(sc-764)	2
Anti mSin3A	Santa cruz	(sc-994)	2
Anti HDAC1	Santa cruz	(sc-7872)	2
Anti PCAF	Santa cruz	(sc-13124)	2
Anti CBP	Santa cruz	(sc-25748)	2

Tabla 5.- Condiciones de amplificación en el ChIP.

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 6.- Oligonucleótidos específicos utilizados para los ensayos de ChIP.

NOMBRE	OLIGO UP/DN
Promotor de la GCL catalítica:	5'-TGTAAGCATGAGGCTCCCTCC-3' 5'-TTCCTACTTGCGACCCAAGG-3'
Promotor de la GCL reguladora:	5'-TCGACCAGTTTCAATTCTCTATCC-3' 5'-GAGTATTTGGGCTTCCTGACATT-3'
Promotor de <i>egr-1</i> :	5'-GTAGAACCCCGGCCTGACTC-3' 5'-AGGCTCCTGGAGTTCCCAGC-3'
Promotor de <i>icam-1</i> :	5'-GGGATGGCCGTCTGACTA-3' 5'-GCCACTTCCCGGAAACCT-3'
Promotor de <i>inos-2</i> :	5'-GGTGCAGCTAAGAAAAGCCTCC-3' 5'-TTTATACCCATCCACGCTCTGC-3'
Promotor de <i>tnf-α</i> :	5'-GGTGAGGACGGAGAGGAGATT-3' 5'-TGGGAGTTAGTACCAGGGTGTTTC-3'

El número experimentos para cada ChIP (N=3) aparece indicado en la leyenda de la figura correspondiente de los resultados.

3.5. Actividad de la ribonucleasa pancreática.

La determinación de la actividad de la ribonucleasa se ha realizado por espectrofotometría. El método está basado en la distinta solubilidad que presentan los nucleótidos en ácido perclórico en comparación con el ARN (Glitz y Dekker, 1964). Los nucleótidos son solubles en ácido perclórico,

MATERIALES Y MÉTODOS

mientras que el ARN precipita. Para la determinación de la actividad RNasa pancreática utilizamos el método de Glitz y Dekker, con ligeras modificaciones y utilizando extractos citosólicos de páncreas.

3.5.1. Procesado de las muestras.

Se preparon extractos citosólicos de páncreas de ratas, extraídos inmediatamente después del sacrificio del animal (1h post-inducción), en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,4 que contenía ortovanadato sódico 100 μ M y el cóctel de inhibidores de proteasas (5 μ l/ml). Se utilizó 1 ml de tampón por cada 100 mg de tejido pancreático manteniendo las muestras en frío para su homogenización. Los homogenados fueron centrifugados a 200.000 *xg* durante 1 h y se recogieron los sobrenadantes para realizar las determinaciones.

3.5.2. Procedimiento.

Los reactivos y el material utilizados para el experimento fueron autoclavados y esterilizados previamente a la consecución del experimento.

Para llevar a cabo el ensayo se mezclan los siguientes componentes:

o Imidazol 0,1 M, pH=7	0,6 ml
o BSA 1%	0,2 ml
o Muestra	100 μ l
o H ₂ O bidestilada	0,5 ml
o ARN de levadura (Tourula Y.) 1,5%	0,2 ml

La reacción comienza al añadir en última instancia el ARN. Se incuba la reacción a 28°C y se toman alícuotas de 0,5 ml a tiempo 0 y otra a los 2 min.

Las alícuotas se precipitan inmediatamente con 1 ml de ácido perclórico muy frío al 10% y se agita vigorosamente hasta la obtención de un precipitado. El tiempo 0 requiere la adición inmediata de ácido perclórico ya que el ARN empieza a degradarse rápidamente si hay actividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Una vez obtenidos los precipitados, se diluyen las preparaciones con 2 ml de H₂O y se centrifugan durante 10 minutos a 10.000 *xg*.

Se determina la concentración de ARN midiendo la absorbancia del sobrenadante a 260 nm.

3.5.3. Cálculos.

Para determinar la actividad ribonucleasa se calcula el incremento de absorbancia. Un incremento de la densidad óptica de 0,25 se considera como una unidad de actividad enzimática (Kutnitz, 1946).

Los valores se expresan en unidades kunitz/mg prot.

3.6. Tasa de degradación de glutatión reducido en el páncreas.

El método para determinar la tasa de degradación de GSH fue diseñado por nuestro grupo de investigación con el objeto de detectar y caracterizar la hidrólisis de GSH en el páncreas durante la pancreatitis aguda, así como el efecto del inhibidor de serín peptidasas 2,4-aminoetil bencenil sulfonil fluoruro (AEBSF) sobre esa hidrólisis. Las actividades se realizaron *in vivo* y a partir de tejido pancreático congelado. En pruebas preliminares se vio que no existían diferencias significativas entre hacer las determinaciones a partir de tejido fresco o congelado. En las pruebas preliminares se probaron distintos tiempos de sacrificio de los animales (a 15, 30, 45 y 60 min después de la inducción de la PA necrótica) y distintos tiempos de incubación de las muestras (durante 5, 15, 30 y 60 minutos) a 37°C, y donde se apreciaba un mayor efecto fue en ratas sacrificadas 30 min post-inducción y a un tiempo de incubación a 37°C de 5 min. Los resultados mostrados en esta tesis y el protocolo descrito a continuación están desarrollados con estas últimas condiciones (30 min de PA necrótica y 5 min de incubación).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.6.1. Procesado de las muestras.

Se utilizaron trozos de páncreas de entre 200-250 mg, los cuales fueron homogeneizados en tampón de homogeneización con una relación de 1 ml por cada 100 mg de tejido. El tampón de homogeneización utilizado fue tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,4 con inhibidores de proteasas, fosfatasas, γ -GT y GCL (tabla 7).

Los homogenados se centrifugaron durante 20 min a 13.000 *xg*, descartando el precipitado. Las muestras se mantuvieron en todo momento en frío.

Los extractos citosólicos se obtuvieron por ultracentrifugación de homogenados durante 1 h a 200.000 *xg* (4°C). En ellos se aumentó la concentración de acivicina en el tampón para eliminar por completo la interferencia de la actividad γ -GT (tabla 7).

Una vez obtenidos los sobrenadantes, se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

3.6.2. Procedimiento.

La determinación de la tasa de degradación de glutatión reducido se realiza en presencia de GSH exógeno para que no sea limitante su concentración, y en presencia y ausencia del AEBSF, que en estudios previos inhibía la depleción de GSH inducida por taurocolato sódico *in vitro*. También se determinó la tasa de degradación de GSH endógeno en extractos citosólicos de páncreas, y en estos casos no se añadió GSH exógeno.

- 1.- Se prepara una solución diluída de 2 ml de cada una de las muestras, a las cuales se le adiciona GSH 2 mM (se añadieron 0,4 ml de una solución madre de GSH 10 mM a 1,6 ml de homogenado).
- 2.- Se toman 2 alícuotas de cada muestra de 1ml; una de las alícuotas se incuba en presencia de AEBSF 1 mM y otra se incuba en ausencia de AEBSF.
- 3.- Se incuban las muestras durante 5 min a 37°C y en agitación.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 4.- Se recogen alícuotas de 0,2 ml de cada muestra, a tiempo 0 y a los 5 min de incubación.
- 5.- Se para la reacción con 0,2 ml de PCA al 12% y EDTA 2 mM para quedar una solución final de PCA al 6% y EDTA 1 mM.
- 6.- Se centrifugan las muestras durante 20 min a 13.000 *xg* (en el caso de homogenados) o 1 h a 200.000 *xg* (en el caso de los extractos citosólicos) y se recoge el sobrenadante.

3.6.3. Cálculos.

Se determina la concentración de GSH por el método de Brigelius y colaboradores (apartado 3.2 de métodos) a tiempo 0 y 5 min de incubación.

La tasa se calcula restando la concentración de GSH a los 5 min, de la que había a tiempo 0, y posteriormente se divide por los 5 min de incubación y se aplican los distintos factores de dilución.

Los resultados de la tasa de degradación de GSH los hemos expresado en nmol/min x mg proteína y en $\mu\text{mol}/\text{min}$ x g tejido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 7.-Inhibidores utilizados en el tampón de homogenización para la determinación de la tasa de degradación de GSH en homogenados y extractos citosólicos de páncreas de rata.

INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN	EFFECTO INHIBITORIO SOBRE
EDTA	5 mM	Quelante de metales pesados.
Ortovanadato sódico	0,1 mM	ATPasas; Tirosín fosfatasas.
Butionina sulfoximina (BSO)	1 mM	GCL.
Acivicina	0,01 mM (Homogenados) 0,25 mM (Extractos citosólicos)	γ -GT.
Aprotinina	0,08 mM	Serín peptidasas.
Leupeptina	0,02 mM	Serín y cisteín proteasas.
Bestatina	0,04 mM	Aminopeptidasas; metaloproteasas.
Pepstatina A	0,015 mM	Cisteín proteasas.
E64	0,014 mM	Cisteín proteasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.7. Tasa de formación de glutamato y cisteína en el páncreas.

El método para determinar la tasa de formación de glutamato y cisteína también fue diseñado por nuestro grupo de investigación con el objeto de detectar y caracterizar la formación de glutamato y de cisteína a partir de GSH en extractos pancreáticos y el efecto del 2,4-aminoetil bencenil sulfonil fluoruro (AEBSF), sobre esa formación. La actividad se determinó en los mismos homogenados y extractos citosólicos de páncreas preparados para la tasa de degradación de GSH.

3.7.1. Procedimiento.

La concentración de glutamato y cisteína se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo el método descrito por Reed y colaboradores (Reed y colaboradores., 1980). Este método se basa en la separación de los S-carboximetildinitro derivados por cromatografía y posterior cuantificación a 365 nm. A todas las muestras se les añade una concentración conocida de patrón interno, el cual nos va a permitir calcular la concentración de la sustancia problema de un modo más exacto. Se utilizó γ -glutamil-glutamato como patrón interno para la determinación de la concentración de glutamato y cisteína en el páncreas, previa calibración frente a patrones de concentraciones conocidas de GSH y GSSG.

Con esta técnica cromatográfica se pueden determinar las concentraciones tanto de cisteína como de glutamato en la misma muestra. Sin embargo, el método de Reed y colaboradores no debe utilizarse para determinar los niveles de GSSG, ya que el glutatión sufre una auto-oxidación en el proceso de derivatización de las muestras (Asensi y colaboradores., 1994). De este modo, parte del GSH se oxida a GSSG dando un falso aumento del mismo.

3.7.1.1. Derivatización de la muestra.

Se toman 200 μ l de sobrenadante ácido y se le añade 20 μ l de patrón interno.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación añadimos 20 μ l de ácido iodoacético 1 M disuelto en púrpura de metacresol 0.2 mM, que es un indicador de pH que vira a color púrpura entre pH 8,5 y 9.

La mezcla se lleva a pH 8,5 – 9 usando un tampón KOH 3 M, CHES 0.3 M y una vez alcanzado el pH adecuado, se incuba la muestra durante 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente.

Al acabar la incubación se añade 400 μ l de 1-fluoro dinitrobenceno al 1% en etanol absoluto, y se mantiene a 4°C y en oscuridad durante un mínimo de 4 h. Llegado a este punto las muestras son estables a 4°C durante varias semanas.

Antes de preparar la dilución que será inyectada en el HPLC, las muestras se centrifugan a 15.000 *xg* durante 5 min a 4°C. De ahí se toman 50 μ l de sobrenadante a los que añadimos 270 μ l de una mezcla metanol - agua en proporción 4:1.

3.7.1.2. Técnica cromatográfica.

Se inyectan 80 μ l de la solución que contiene la muestra diluida antes indicada.

La fase móvil está constituida por 2 solventes:

- o Eluyente A: solución de metanol al 80% en agua bidestilada.
- o Eluyente B: solución de Eluyente A al 80% y solución madre (164 g de acetato sódico anhidro, 29,5 ml de H₂O bidestilada y 378 ml de ácido acético glacial) al 20%.
- o Todo el proceso se realiza a un flujo constante de 1 ml/minuto. La elución de las sustancias que interesan se realiza aplicando un gradiente:
- o La fase móvil se mantiene durante 5 min a un 20% del eluyente B y un 80% del eluyente A.

MATERIALES Y MÉTODOS

- o Tras este tiempo comienza a aumentar la cantidad de eluyente B de manera lineal, hasta que a los 15 min del cromatograma se alcanza un 99% de B y un 1% de A.
- o Se mantienen estas proporciones de cada solvente de 5 a 10 min, dependiendo del tiempo de elución del último compuesto.
- o Una vez eluido el último compuesto de interés, se procede al re-equilibrado de la columna. Para ello, se alcanzan las condiciones iniciales (20% de B y 80 % de A) manteniéndose así durante un mínimo de 15 min.

3.7.1.3. Cálculos.

Las concentraciones de glutamato y cisteína en las muestras se calculan en el cromatograma basándose en una concentración conocida de patrón interno, que es añadida a cada muestra en el proceso de derivatización.

Las tasas de liberación de glutamato y cisteína se obtienen a partir de la resta de las concentraciones a los tiempos 5 min de las incubaciones, menos las concentraciones de los tiempos 0 y posteriormente se divide por los 5 min de incubación y se aplican los distintos factores de dilución.

Las tasas de liberación de glutamato y cisteína las hemos expresado en nmol/min x mg de proteína y en μ mol/min x g de tejido.

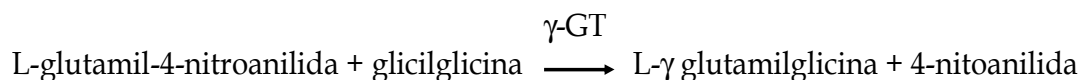
3.8. Actividad de la γ -glutamil transpeptidasa.

La actividad de la g-glutamil transpeptidasa (γ -GT) se midió con el objeto de detectar si en en los homogenados y en los extractos citosólicos preparados en el apartado 3.6 había presencia de la enzima γ -GT.

Para la detección de la actividad de la γ -GT se utilizó una modificación del método de Szasz (Szasz, 1969).

MATERIALES Y MÉTODOS

Además de hidrolizar el glutatión y catalizar la transferencia del grupo γ -glutamilo del mismo, la γ -glutamil transpeptidasa también cataliza la transferencia del grupo glutamilo de la γ -glutamyl-4-nitroanilida. El rango de liberación de 4-nitroanilida es directamente proporcional a la actividad de la γ -glutamil transpeptidasa en la muestra y se cuantifica midiendo el incremento a 405 nm.



3.8.1 Procedimiento en tampón Tris a pH 8,25 (condiciones óptimas de la γ -GT).

- 1.- Se prepara la solución de reacción para la γ -GT disolviendo γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 2,9 mM y glicilglicina 100 mM en Tris 0,1 M a pH 8,25. Para disolverlo bien, se calienta durante 30 min en un baño con agua a ebullición.
- 2.- Se mezclan 1 ml de la solución reactiva para la γ -GT y 50 μ l de cada homogenado. Cada muestra se analizó por duplicado y se realizaron dos blancos a los que se les añadió 50 μ l de agua.
- 3.- Se incuban a 37°C.
- 4.- Se para la reacción a los 5 min de incubación por adición de ácido acético 4 N.
- 5.- Se centrifugan las muestras 10 min a 3.500 xg .
- 6.- Se mide la absorbancia de las muestras por espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm.

3.8.2. Procedimiento en tampón fosfato 0,1 M a pH 7, 4.

Se decidió medir la actividad γ -GT en las condiciones del experimento de la tasa de degradación de GSH en homogenados de páncreas para ver si la γ -GT pudiera ser responsable de la degradación de GSH detectada en páncreas de ratas con pancreatitis aguda necrótica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se disolvió γ -glutamyl-4-nitroanilida 2,9 mM en tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 7,4.

Se incubaron las muestras a 37°C durante 5 min y se pararon las reacciones con ácido acético 4 N.

Se midió la absorbancia a 405 nm.

3.8.3. Cálculos.

Para calcular la concentración de 4-nitroanilida se utiliza el coeficiente de extinción molar de la γ -glutamyl-4-nitroanilida a 405 nm ($\epsilon = 9,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizando la siguiente formula, siendo E1 la absorbancia de cada muestra y E0 la absorbancia del blanco. Se expresó la concentración de la 4-p-nitroanilida en $\mu\text{mol/ ml}$.

$$[4\text{-nitroanilida}] = \frac{(E1-E0)}{9,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \times \frac{\text{vol. total (ml)}}{\text{vol. Muestra (ml)}}$$

La actividad γ -GT se determinó restando la concentración inicial de 4-nitroanilida a la concentración final de 4-p-nitroanilida en las muestras, y se dividió por los 5 min de incubación.

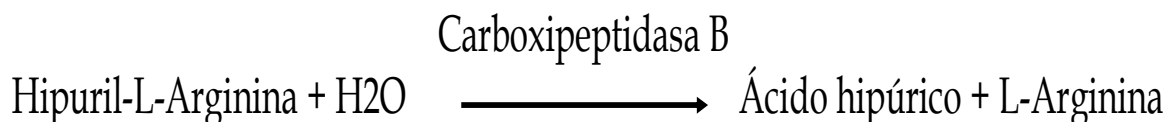
Los valores de la actividad γ -GT (o tasa de formación de 4-nitroanilida) se expresaron en nanomol/minuto x miligramo de proteína y en porcentaje de actividad.

3.9. Actividad de la carboxipeptidasa B pancreática.

La actividad de la carboxipeptidasa B (CPB) se determinó *in vitro* con CPB pancreática porcina (Sigma-Aldrich Química) en presencia y ausencia de AEBSF, realizando un total de 4 réplicas del experimento y utilizando el método de y colaboradores (Folk y colaboradores, 1961). Este método esta basado en el diferente espectro de absorción que presenta el

MATERIALES Y MÉTODOS

ácido hipúrico respecto a la hipuril-L-arginina a 254 nm. La carboxipeptidasa B cataliza la conversión del hipuril-L-arginina a ácido hipúrico.



3.9.1. Procedimiento.

La reacción se lleva a cabo en tampón Tris 25 mM con NaCl 100 mM, pH 7,7 a 25°C. Se preparó la solución de sustrato disolviendo hipuril-L-arginina 1 mM en 100 mL del tampón Tris; para disolverlo se pone en agitación a 50°C; una vez disueltos se mantiene en frío.

Se mezclan en una cubeta espectrofotométrica de cuarzo 2,9 ml de la solución sustrato y 0,1 ml de una solución acuosa que presentaba 10 unidades de la enzima pura (1 mg de producto que contenía 125 unidades de enzima), y en otra cubeta se ponen 2,9 ml de la solución sustrato y 0,1 ml de agua como blanco. Se midió la absorbancia a 254 nm a tiempo cero, se añadió la enzima y después se midió la absorbancia a cada minuto durante los primeros 5 min, tomándose este último tiempo para hacer los cálculos en base a la linealidad de la reacción.

Además de realizar el experimento en tampón Tris, también se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,4 para ver si la carboxipeptidasa B era activa en ese tampón. Tanto en tampón Tris como en tampón fosfato potásico, el ensayo se hizo en presencia y en ausencia de AEBSF 1mM para ver si el AEBSF podía afectar a la actividad carboxipeptidasa B.

3.9.2. Cálculos.

Para los cálculos se usa la siguiente fórmula:

MATERIALES Y MÉTODOS

$$\text{U.A Carboxipeptidasa B/ml} = \frac{(\text{A}_{254\text{nm}} \text{ muestra} - \text{A}_{254\text{nm}} \text{ blanco}) / \text{minuto} \times 3}{0,36 \times 0,1}$$

Donde 3 son los mililitros totales de reacción, 0,36 es el coeficiente de extinción molar del ácido hipúrico, y 0,1 son los mililitro por miligramo de enzima utilizados.

3.10. Tasa de degradación de glutatión reducido en presencia de la tripsina o la carboxipeptidasa B.

Se realizaron un total de 4 réplicas del experimento siguiendo el mismo procedimiento que para la determinación de la tasa de degradación de GSH (apartado 3.6 de métodos), sólo que en vez de añadir 1,6 ml de muestra se añadió una solución de 1,6 ml de tampón de homogenización que presentaba 10 unidades de carboxipeptidasa B o de tripsina, según fuese el caso.

3.11. Cromatografía de afinidad.

La cromatografía de afinidad es un tipo especial de cromatografía de adsorción sólido-líquido en la que moléculas (anticuerpos, cofactores, inhibidores enzimáticos, lectinas y otras moléculas) denominadas ligandos de afinidad y enlazadas químicamente en soportes sólidos adecuados, retienen a los solutos (analitos), también de naturaleza bioquímica, de manera reversible y selectiva. Las separaciones se basan en el acoplamiento "llave-cerradura" típico de la Biología Molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este tipo de cromatografía permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad al ligando. Después de que las proteínas que no se unen al ligando son lavadas o eluidas a través de la columna, la proteína de interés que ha quedado retenida en la columna se eluye o libera mediante el empleo de una solución que contiene bien ligando libre, u otro compuesto que rompa la interacción entre el ligando y la proteína.

La cromatografía de afinidad tiene una serie de características generales que la distinguen de otros tipos de cromatografía líquidas:

- o Alta selectividad en el mecanismo de retención.
 - o Campo de aplicación restringido.
 - o Separación de un solo soluto-analito.
 - o Empleo de sistema de baja presión.
 - o Columnas cortas de escasa eficacia cromatográfica.
- **Ligandos de afinidad.**

Son los responsables de la adsorción específica de los solutos-analitos. Se clasifican según su peso molecular:

- o Moléculas de alto peso molecular.
- o Moléculas de bajo peso molecular.

Según su selectividad en la retención:

- o Ligandos específicos: se enlazan reversiblemente a un solo soluto, por ejemplo anticuerpos.
- o Ligandos generales (enlazados con un determinado grupo de compuestos bioquímicos, como las lectinas y nucleótidos).

- **Soportes.**

Son los materiales sobre cuya superficie activada se establece el enlace covalente con el ligando de afinidad. Deben poseer propiedades

MATERIALES Y MÉTODOS

como: gran superficie, tamaño del grano y porosidad controlable, carácter suficientemente hidrofílico para evitar adsorciones no específicas de proteínas u otras moléculas, y estabilidad mecánica para trabajar a alta presión.

Los materiales utilizados generalmente como soporte son geles orgánicos derivados de los polisacáridos como la agarosa (sepharosa), polímeros de acrilamida, fractogel TSK y sílices CPG.

- **Inmovilización de ligandos.**

La inmovilización de los ligandos de afinidad es un proceso complejo que en cada caso tiene connotaciones específicas.

En general, los ligandos de afinidad se inmovilizan mediante el establecimiento de enlaces químicos covalentes con el soporte sólido activado y un grupo reactivo del ligando que esté lo más lejos posible de la zona activa de bioadsorción.

El objetivo de la inmovilización consiste en obtener una capa estable y densa del ligando bioquímico que conserve su actividad específica con plenitud.

La inmovilización del ligando de afinidad se realiza en general mediante dos etapas secuenciales:

Activación del soporte, que consiste en el ataque químico con diferentes reactivos de la superficie de los soportes antes mencionados, que se caracterizan por poseer grupos hidroxilos superficiales. De la gran variedad de procedimientos, el más común es el ataque con bromuro de cianógeno sobre la matriz de polisacárido. Según el tipo de matriz se originan grupos diferentes: ésteres cianato en agarosa e imidocarbonatos en dextranos, según reaccionen uno o dos grupos hidroxilos de la matriz. Esta etapa se produce en un disolvente orgánico o en mezclas con agua. Luego sigue el anclaje químico del ligando, que se da mediante la reacción de grupos amino del mismo con el soporte activado.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Metodos de elución.**

Según la naturaleza de los ligandos de afinidad y la de los solutos-analitos, y teniendo en cuenta la forma de eliminar los solutos de la columna, cabe distinguir dos procedimientos generales de elución:

- o Elución bioespecífica

La fase móvil contiene a un modificador (generalmente llamado inhibidor), que en realidad se trata de un ligando de afinidad no ligado de bajo peso molecular que interacciona con el sitio activo de la macromolécula biológica que puede ser soluto-analito, o bien el ligando de afinidad para solutos de bajo peso molecular, produciéndose en todos los casos una elución por desplazamiento o competencia entre los componentes de bajo peso molecular ligados o no, con el sitio activo de la macromolécula biológica ligada o libre. Se distinguen 2 tipos de elución bioespecífica, la normal y la invertida.

- Elución normal

Se basa en la interacción inhibidor-analito, que es la situación más frecuente. El analito es una biosustancia macromolecular que es retenida por un ligando de afinidad de bajo peso molecular, y eluida con un inhibidor que es también de bajo peso molecular y que tiene preferencia por el sitio activo del analito, por lo que es retirada del sólido y eluida. Ejemplo, la purificación de la lectina.

- Elución invertida

Se basa en la interacción inhibidor-ligando de afinidad, el cual es una biomacromolécula que retiene específicamente el analito. La presencia del inhibidor en la fase móvil provoca un desplazamiento análogo al anterior, y se eluye el analito.

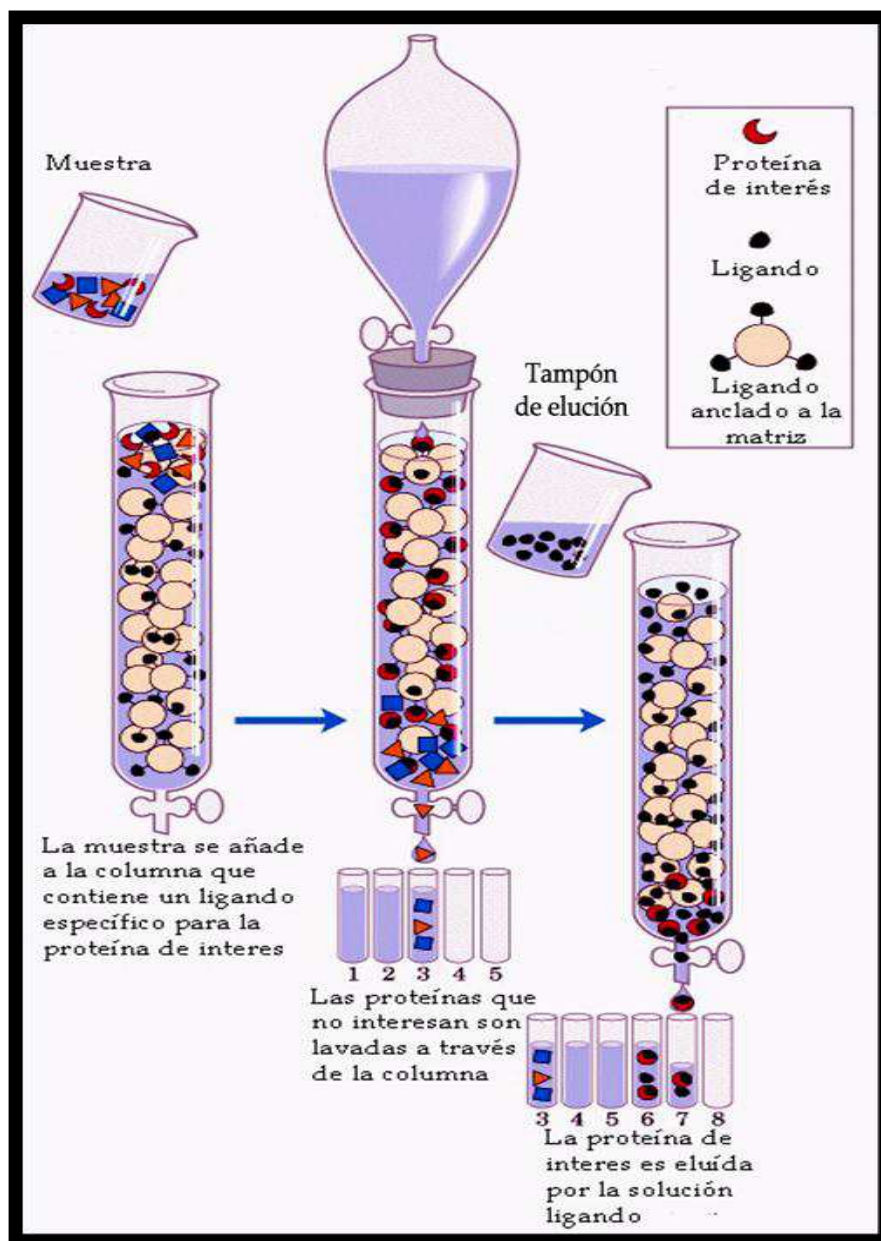
- o Elución no bioespecífica

La fase móvil provoca la desnaturalización del ligando inmovilizado, del soluto-analito o de ambos mediante el cambio suave y reversible de los

MATERIALES Y MÉTODOS

correspondientes sitios activos, de tal manera que se interrumpe la adsorción bioespecífica mediante eliminación de una o varias de las causas que la provocan.

Figura 27.- Esquema de la cromatografía de afinidad.



MATERIALES Y MÉTODOS

3.11.1. Cromatografía de afinidad de proteínas afines al GSH.

Para purificar proteínas afines por el GSH, se utilizó un kit disponible comercialmente (Novagen). Este Kit está compuesto por una fase estacionaria unida a GSH. El tampón de elución también lleva GSH en forma libre. La cromatografía se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.11.1.1. Procesado de las muestras.

Para proceder a la cromatografía de afinidad, se juntaron 5 extractos citosólicos de páncreas de ratas (*pool*) con pancreatitis aguda necrótica sacrificadas a los 30 min de la inducción de la PA, preparados inmediatamente después del sacrificio. Se cargaron 20 mg de proteína total por columna, en dos columnas proporcionadas con el kit.

3.11.1.2. Procedimiento.

- 1.- Se preparan las diluciones de tampones de lavado y de elución con H₂O desionizada esteril. El tampón de elución estaba compuesto por Tris-HCL 50 mM, pH 8.0, con GSH 10 mM.
- 2.- Se mezcla suavemente por inversión la resina hasta su completa resuspensión, y se añaden 5 ml de resina para tener una columna con aproximadamente 2.5 ml de resina (proveída al 50%). Hay que dejar que se compacte la columna por gravedad.
- 3.- Cuando el tampón de la resina (etanol 20%) se ha eluido completamente, se lava la resina con 5 volúmenes de tampón de lavado y se permite la completa elución de la resina.
- 4.- Llevar la muestra a T^a ambiente antes de cargarla en la columna. Se carga la muestra con una cantidad de 20 mg de proteína total por columna (retención máxima de las columnas= 20 mg de proteína).
- 5.- Se controla el flujo de elución. En nuestros experimentos el flujo fue 0,35-0,45 ml/min. Este flujo estaba dentro de la idoneidad, ya que con un flujo mayor se recogen más impurezas en la fracción eluída.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 6.- Se lava cada columna con 10 volúmenes de tampón de lavado.
- 7.- Se eluyen las proteínas unidas a la resina con 3 volúmenes de tampón de elución. Se recoge el eluido y se mantiene en frío.
- 8.- El eluato se puede concentrar al máximo con tubos especiales para concentrar muestras. Estos tubos presentan un filtro que retiene moléculas superiores a los 3 KDa. En nuestro caso, se paso de tener 7,5 ml de eluido a tener 0,6 ml de volumen final. Se determinó la cantidad de proteínas en los eluatos de las dos columnas cargadas y se congelaron a -80°C para su posterior análisis.

3.11.2. Cromatografía de afinidad de proteínas afines al AEBSF.

La cromatografía de afinidad de proteínas afines al AEBSF fue más laboriosa que la de proteínas afines al GSH, debido a que hasta la fecha no existe ninguna fase estacionaria disponible comercialmente que presente AEBSF como ligando.

Para este propósito se utilizó una resina cuyo ligando era la avidina capaz de retener moléculas de biotina. Lo que se planteó fue la biotinilación del AEBSF por su extremo amino con una biotina adecuada, la N-hidroxisuccinimidobiotina (Thermo Scientific), su incubación con la muestra y su posterior carga en las columnas de avidina.

Para realizar todos los pasos de la cromatografía de afinidad de proteínas afines al AEBSF, se aplicaron otras tres técnicas más como fueron la biotinilación del AEBSF, el seguimiento del éxito de la reacción por cromatografía en capa fina, y después de la incubación de la muestra con el AEBSF-biotinilado, la eliminación del exceso de biotina o de AEBSF libres por una cromatografía de exclusión.

La cromatografía de afinidad por el AEBSF fue desarrollada en paralelo con la de GSH y con el mismo *pool* de extractos citosólicos, cargándose 2,4 mg de proteína por columna, en dos columnas de avidina (Thermo Scientific).

3.11.2.1. Biotinilación del AEBSF.

MATERIALES Y MÉTODOS

La biotinyación del AEBSF se realizó equimolecularmente para tratar de evitar un exceso de biotina o de AEBSF en la reacción. Si hubiese un exceso de biotina en la solución, al incubarse con la muestra podría reaccionar de forma inespecífica con las proteínas y dar lugar a la aparición de proteínas no deseadas en los eluatos, y si fuese el AEBSF el que estuviera en exceso, podría competir con el AEBSF-biotinyado por las proteínas de interés.

Para llevar a cabo la reacción, se prepara una solución de 4,58 μ moles de NHS-biotina en DMSO (4,02 mg en 1,18 ml de DMSO) y otra de 4,58 μ moles de AEBSF en PBS (2,83 mg en 1,18 ml de PBS). Las dos soluciones se incuban juntas (1 volumen igual de cada solución) durante 30 min a temperatura ambiente y se procede a la comprobación de la reacción mediante cromatografía en capa fina.

3.11.2.2. Seguimiento de la biotinyación. Cromatografía en capa fina.

El éxito de la biotinyación de AEBSF fue comprobado de manera sencilla por cromatografía en capa fina.

- **Cromatografía en capa fina**

Esta técnica permite analizar mezclas de compuestos. Para ello, la muestra se aplica por medio de un tubo capilar en la superficie de una capa fina adsorbente en forma de banda, punto o mancha, y es adsorbida en la superficie por la acción de fuerzas electrostáticas (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, efectos inductivos, etc). Los adsorbentes más utilizados son gel de sílica, aluminio, tierra silíceo, celulosa y poliamidas. Como soportes del adsorbente se utilizan láminas o placas de vidrio, plásticas o metálicas; algunas placas tienen indicador de fluorescencia.

La placa seca se coloca en el tanque cromatográfico o cámara, en el cual debe encontrarse saturado el eluyente (fase móvil líquida). El eluyente ascenderá por capilaridad en la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo “manchas” que representan a los componentes, la separación se da por migración diferencial, es decir que la fase móvil arrastra a las sustancias apolares y aquellas más polares son retenidas por la fase estacionaria dando lugar a la separación. Posteriormente, se

MATERIALES Y MÉTODOS

evapora el eluyente y la placa se analiza por medio de métodos químicos en los que por inmersión o rociado se obtienen derivados coloreados o fluorescentes (adición de ninhidrina a aminas, ácido sulfúrico para carbonizar compuestos orgánicos, etc), o por medio de métodos físicos ópticos utilizando radiación UV o luz visible.

El análisis es de tipo cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo. En el primero se hacen comparaciones visuales de color e intensidad, y de propiedades UV entre otras. En el semicuantitativo se observa diámetro y comparación visual e intensidad del color de la mancha frente a muchas manchas patrones de concentración conocida. Y en la forma cuantitativa se pueden realizar medidas de transmisión a través de la sustancia y medidas de emisión o medida de luz reflejada desde la sustancia, y espectrofotometría por fluorescencia.

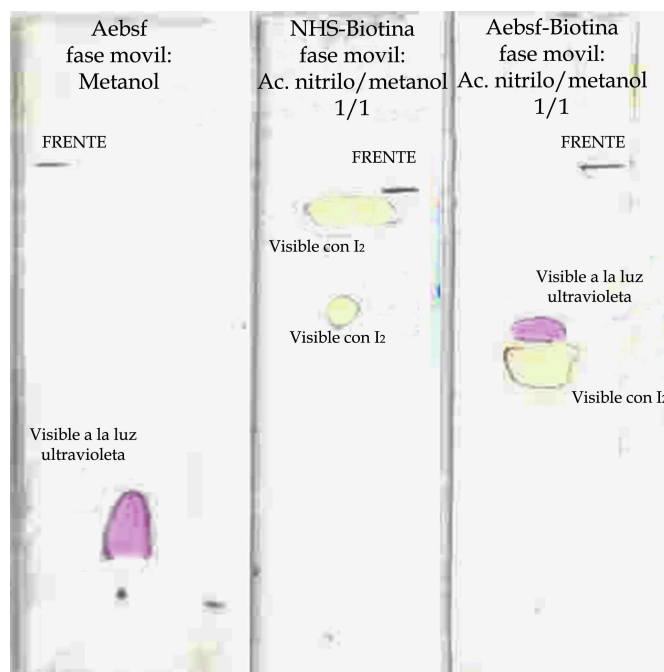
La capa fina del AEBSF-biotinilado se determinó utilizando como fases móviles metanol y una solución de metanol/acetato de nitrilo 1/1. Se impregnaron tres manchas en la capa fina, una de AEBSF, una de biotina y otra de AEBSF-biotinilado. Para el revelado, la presencia de un anillo aromático en la estructura del AEBSF permite su visibilidad a la luz ultravioleta, mientras que la biotina no presenta ningún anillo aromático y no es visible a la luz ultravioleta, y por ello para su revelado es necesaria la impregnación de la placa en yodo.

La mancha de AEBSF no sufrió ningún tipo de desplazamiento a lo largo de la placa ni siquiera en metanol, que era el solvente más hidrofóbico de las dos fases móviles utilizadas, mientras que la biotina se desplaza considerablemente en la fase estacionaria compuesta por metanol/acetato de nitrilo.

Al revelar las tres tiras, resultó que en la que se había impregnado con el AEBSF-biotinilado aparecía una mancha visible al ultravioleta que se había desplazado a lo largo del soporte. Esto indicaba que la reacción había funcionado, ya que el desplazamiento era debido a la presencia de la biotina y la visibilidad a la luz ultravioleta indicaba la presencia del anillo aromático del AEBSF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 28.- Revelado de la cromatografía en capa fina del AEBSF biotinilado.



3.11.2.3. Incubación del AEBSF-biotinilado con las muestras y finalización del proceso por cromatografía de exclusión.

El AEBSF-biotinilado fue incubado durante 15 min con la mezcla de extractos citosólicos preparados para la cromatografía de afinidad de GSH. El volumen total fue de 1,6 ml conteniendo una concentración final de 4 mg de proteínas totales y una concentración estimada de AEBSF de 1mM (similar a la que utilizábamos para la tasa de degradación de GSH). Se realizaron dos incubaciones con dos alícuotas de la mezcla de extractos citosólicos. El tiempo de incubación se escogió en base a los experimentos de cuantificación de biotina realizados con un kit disponible para ello (Thermo Scientific).

Pasados los 15 min de incubación, se paró la reacción por eliminación de la biotina y otras moléculas pequeñas con una

MATERIALES Y MÉTODOS

cromatografía de exclusión, para que la biotina que hubiera quedado libre no pudiera reaccionar con las proteínas presentes en la muestra.

- **Cromatografía de exclusión.**

También llamada cromatografía de filtración en gel, se basa en la diferencia de penetración de las moléculas en los poros de la fase estacionaria porque la separación obtenida depende del tamaño de la molécula. El tiempo de elución es proporcional al peso molecular de las mismas, por lo que no es muy usada con los compuestos de alto peso molecular. Este tipo de separación por tamaño difiere de las demás técnicas de cromatografía en que no existen interacciones físicas o químicas entre el analito y la fase estacionaria. Es una técnica reproducible, escalable y rápida.

La fase fija está formada por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros por los que pueden penetrar las moléculas de pequeño tamaño. Las moléculas de tamaño grande se excluyen totalmente y son eluidas en primer lugar, mientras que las de pequeño tamaño tienen acceso a todo el volumen poroso y son las últimas que se eluyen; de esto se deduce que el volumen disponible para las moléculas pequeñas es mayor que para las grandes. Por lo tanto, las moléculas se eluyen por su tamaño decreciente.

Los diferentes tipos de partículas usadas deben ser estables, mecánica y químicamente, tener bajo contenido en grupos iónicos, uniformidad de poro y tamaño. Los compuestos pueden ser derivados de dextranos (Sephadex), derivados de agarosa (Sephacosa), derivados de acrilamidas (Biogel P) y esferas de vidrio. Hay diferentes tamaños de partícula para un gel: a menor tamaño mayor resolución y menor gasto en la columna.

Las columnas utilizadas presentaban una fase estacionaria compuesta por dextrano (Thermo Scientific) y presentaban un volumen de 10 ml que admitía el paso de hasta 2,5 ml de muestra en una vez.

Después de equilibrar la columna con tampón de equilibrio (tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,4), se cargaron las muestras en dos columnas y se hicieron 6 lavados con el mismo tampón de equilibrio, se

MATERIALES Y MÉTODOS

recogieron todas las fracciones y se midió la absorbancia a 280 nm para ver en cual de ellas estaban las proteínas. La alícuota que presentó el pico de absorción a 280 nm fue mantenida en hielo para seguir con el proceso de purificación, el resto fueron desechadas. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry. Las muestras presentaban 2,4 y 2,6 mg de proteínas totales respectivamente, en 1,5 ml de volumen de muestra.

3.11.2.4. Cromatografía de afinidad a la avidina. Purificación de las proteínas afines al AEBSF-biotinilado.

Una vez realizado todo el proceso de biotinylation del AEBSF e incubación con los extractos citosólicos, se procedió al último paso utilizando columnas que presentaban avidina como ligando de la fase estacionaria (Thermo Scientific). Para ello se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante. Para la cromatografía de AEBSF, se cargó toda la muestra disponible al final de todo el proceso de biotinylation. Así, partíamos de 4 mg de proteínas totales y al final las muestras presentaban una concentración de 2,4 y 2,6 mg de proteínas, respectivamente (capacidad de retención de las columnas de avidina: 2,5 mg). Se cargaron las muestras en dos columnas de avidina, utilizando un volumen de 1,5 ml por muestra.

Los pasos de esta cromatografía son los siguientes:

- 1.- Se atemperan las columnas y el PBS a temperatura ambiente, y se preparan las diluciones de los tampones de lavado y de elución con H₂O desionizada estéril. El tampón de bloqueo/elución está compuesto por biotina 2 mM en PBS y el de regeneración está compuesto por glicina 0,1 M, pH 2,8.
- 2.- Se abren las columnas para que salga el tampón de almacenamiento de las columnas (las columnas utilizadas venían preparadas con un volumen de resina de 4 ml al 50% con etanol al 20%).
- 3.- Se lava la columna con 8 ml de PBS.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 4.- Se añaden 6 ml de tampón de bloqueo/elución de biotina para bloquear cualquier sitio de unión a la biotina no reversible.
- 5.- Se elimina la biotina de los sitios reversibles añadiendo 12 ml de tampón de regeneración.
- 6.- Se carga la muestra y se controla el flujo de elución. En nuestros experimentos el flujo fue 0,39 y 0,430 ml/min, flujo dentro del rango de idoneidad.
- 7.- Una vez que la muestra pasa a través de la columna, se añade PBS para forzar a la muestra a introducirse completamente en la matriz. En nuestro caso se cargaron 0,5 ml de PBS por columna para llegar a los 2 ml, volumen máximo aceptado por las columnas.
- 8.- Se coloca la columna en un tubo *corning* estéril y se añaden 2 ml de PBS. Este paso se repite 6 veces y se recogen las correspondientes fracciones, midiéndose su absorbancia a 280 nm. Cuando la absorbancia de las fracciones se acerque a la del PBS (blanco), las proteínas no unidas habrán sido eliminadas.
- 9.- Se cambia la columna a otro *corning* estéril y se añaden 2 ml del tampón de elución. Este paso se repite mínimo 6 veces. Se mide la absorbancia de los eluatos a 280 nm y se guardan en frío las fracciones que presenten un pico de absorbancia a 280 nm. El resto de eluatos se desechan. En nuestro experimento, ambas columnas presentaron una sola fracción que presentaba absorbancia a 280 nm, en un caso fue el tercer eluato y en el otro fue el quinto.
- 10.- Los eluatos se concentran con los tubos de concentración de moléculas superiores a 3 KDa. En nuestro caso, a partir de un volumen de 2 ml quedó un volumen de 0,120 ml y 0,180 ml en los eluatos de las dos columnas.

3.12. Identificación proteica de los eluatos cromatográficos. MALDI-TOF y huella peptídica.

3.12.1. Fundamento de la técnica de análisis MALDI-TOF.

El MALDI-TOF es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ ionización láser apoyada por una matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Time-Of-Flight*.

El MALDI-TOF permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros como las proteínas, los péptidos y los azúcares) y moléculas orgánicas grandes (como los polímeros, los dendrímeros y otras macromoléculas) que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales.

Para el análisis, la macromolécula es primero integrada en una matriz sólida que a menudo consiste en un material orgánico como ácido trans-3-indolacrílico y sales inorgánicas como cloruro sódico o trifluoroacetato de plata. Se utiliza una matriz para proteger a la biomolécula de su destrucción y para facilitar la vaporización y la ionización. La muestra es entonces irradiada con un láser pulsado, como un láser de nitrógeno. La mayoría de la energía producida por el láser es absorbida por la matriz provocando la expulsión de iones de la matriz electrónicamente excitados, cationes y macromoléculas neutras, que crean una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra. La macromolécula es ionizada por las colisiones y formación de complejos con pequeños cationes. Las biomoléculas ionizadas son aceleradas en un campo eléctrico (sistema de cuadrupolo), el campo eléctrico se ajusta con unos parámetros para una determinada relación masa/carga, de modo que las moléculas que no cumplan los requisitos de esa relación serán desviadas de la trayectoria. Las moléculas que presentan las características adecuadas y consiguen pasar correctamente a través del campo eléctrico entran en el “tubo de vuelo”.

MATERIALES Y MÉTODOS

El tiempo de vuelo (*TOF*) se basa en que para una energía cinética constante, la masa y la velocidad de los iones están interrelacionadas. Los campos eléctricos se utilizan para darle a los iones una energía cinética conocida. Si se conoce la energía cinética, se sabe la distancia que viajan los iones y también el tiempo que les lleva viajar y entonces se puede determinar la masa de los iones.

El “tubo de vuelo” consiste en un espacio al vacío para permitir a los iones viajar de un extremo del instrumento al otro sin la resistencia producida por el choque con las moléculas de aire, que alterarían la energía cinética de la molécula.

Con esta técnica se pueden detectar moléculas con masas entre 400 y 350.000 Da, y dependiendo de la sofisticación del equipo la sensibilidad puede variar entre un rango de 10^{-15} a 10^{-18} M (femtomolar y attomolar respectivamente).

3.12.2. Procesado de los datos obtenidos por espectrometría de masas. Identificación proteica usando el programa MASCOT.

El MASCOT es un potente programa desarrollado por *Matrix Science* para el análisis de datos proteómicos en red. Este programa tiene recogida numerosa información sobre masas asignadas a infinidad de péptidos. El MASCOT utiliza todas las bases de datos de péptidos y proteínas disponibles (NCBIInr, Trembl, Swissprot, Java script) y compara los datos recogidos en el análisis MALDI-TOF con todos los patrones de péptidos y proteínas conocidos hasta la fecha. Los datos integrados en MASCOT son analizados estadísticamente y al resultado de las proteínas identificadas se le asigna un *score* de probabilidad.

El *score* es $10 \cdot \log(p)$, donde “p” es la probabilidad de que el resultado sea un evento casual ($p < 0,05$), si el péptido o la proteína identificada presenta un *score* \geq al asignado por la búsqueda, indica que los datos del análisis coinciden con la proteína asignada o presenta una alta homología.

El MASCOT permite realizar varios tipos de rastreos de proteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **A partir de la huella peptídica.** La huella peptídica de una proteína es el patrón de péptidos fruto de su digestión por una enzima. La huella peptídica de las proteínas es altamente específica, pudiendo ser suficiente para la identificación de una determinada proteína. Este análisis es mucho más fiable que las identificaciones obtenidas a partir del patrón de migración en PAGE o a partir del tiempo de retención de un HPLC. El *handicap* de este proceso es la elección correcta de la enzima para realizar la digestión. Se debe utilizar una enzima que digiera las proteínas en péptidos con masas por encima del umbral de detección del MALDI-TOF (~500 Da). Se suele utilizar la tripsina o enzimas con una especificidad superior.
- **A partir de un sondeo de secuencia** (*sequences query*), que combina la masa molecular de uno o más péptidos con secuencias y datos de los fragmentos iónicos. La fuente usual de la información de una secuencia peptídica es una interpretación del espectro de masas, determinación que en algunos casos puede ser difícil y ambigua. Sin embargo, habitualmente además del pico principal con el que se hace la primera interpretación, se pueden encontrar una serie de picos que ofrecen datos sobre 3 o 4 residuos de una secuencia peptídica. El primer pico sirve para estrechar el cerco sobre el patrón de la secuencia identificada, y los otros picos ofrecen información sobre posibles variantes y sobre un margen de error asignado a la secuencia de interés. El perfil de las proteínas, en el caso de esta búsqueda, va asignado a posibles variantes de la secuencia y al error de tolerancia cada uno con su *score* probabilístico correspondiente. Toda esta información obtenida ofrece una mayor garantía sobre las proteínas identificadas.
- **A partir del espectro de masas iónico** (MS/MS). Se realiza la búsqueda a partir de los picos obtenidos en la espectrometría de masas y se comparan con un listado de picos conocidos. Se puede realizar la búsqueda de un solo péptido, pero su eficiencia aumenta cuando se compara con listados de péptidos analizados

MATERIALES Y MÉTODOS

por LC-MS/MS (espectrometría de masas con previa separación por cromatografía líquida), de tal manera que la similitud de un número suficiente de péptidos en la muestra con los de una misma proteína ofrece una alta garantía de que la identificación sea correcta. Tiene la ventaja de que se pueden analizar mezclas de proteínas complejas sin previa digestión enzimática, por ejemplo a partir de muestras migradas en geles SDS-PAGE 1D y 2D. Además, tampoco está tan sujeta como el análisis de la huella peptídica a la homología de los péptidos presentes en una muestra con los encontrados en las bases de datos disponibles. La desventaja es que esta técnica presenta una escasa sensibilidad.

3.12.3. Análisis de los eluatos de GSH y AEBSF-biotinilado.

Una vez obtenidos los eluatos de los dos tipos cromatografías de afinidad, fueron enviados para su análisis a sendos servicios de proteómica disponibles en la ciudad de Valencia. Se enviaron alícuotas de los eluatos al servicio de proteómica de la Universidad de Valencia, donde se realizó una electroforesis con los dos eluatos de la cromatografía de afinidad por el GSH y con uno de los eluatos de las proteínas afines al AEBSF-biotinilado. Tras realizarse la electroforesis, se realizó la tinción del gel con plata y posteriormente se procedió a la identificación por MALDI-TOF a partir del bandeo proteico. En el servicio perteneciente al centro de investigación del Príncipe Felipe, se realizó un análisis de la huella peptídica por las técnicas de espectrometría de masas, MALDI-TOF y LC-MALDI. Para confirmar los resultados

3.13. Actividad proteín fosfatasa.

Las actividades *in vivo* de las proteín fosfatasas se determinaron a partir de tejido fresco, y se utilizaron 5 ratas por condición en el caso de las serín/treonín y tirosín fosfatasas, y 3 para la determinación de las actividades MKPs. *In vitro* se realizaron un total de 5 réplicas para el

MATERIALES Y MÉTODOS

seguimiento temporal de la actividad PP2A y de 6 réplicas para determinar el mecanismo de acción de la pentoxifilina.

Para llevar a cabo este propósito, se utilizaron kits comerciales para determinar las actividades serín/treonín y tirosín fosfatasas (Promega). El método utilizado para cuantificar el fosfato libre generado en la reacción es un método no radioactivo que mide espectrofotométricamente la absorbancia de un complejo formado por una sonda de molibdato/verde malaquita unida a fosfatos.

El rango de sensibilidad en la liberación de fosfatos en este sistema es de 100-4000 pmoles de fosfato. La parte inferior de este rango es menos sensible que los métodos radioactivos. Trabajando en la parte alta del rango se reduce la posibilidad de detectar actividades aberrantes producidas por la promiscuidad de algunos fosfatos. En este rango de sensibilidad, se pueden detectar niveles de fosfato del orden nanomolar. Con este método se puede medir la actividad de diversas fosfatasas en muestras parcialmente purificadas y también en extractos de tejidos celulares.

El principio del método es igual para medir la actividad de todas las fosfatasas; no obstante, lo que determinará la especificidad de una fosfatasa u otra será el sustrato fosforilado, el tampón de reacción y los correspondientes inhibidores de fosfatasas utilizados.

- **Tampones para la determinación de la actividad fosfatasa.**

Como la mayoría de las familias de enzimas, las fosfatasas poseen diversas condiciones óptimas y no existe un tampón universal para todas ellas.

Los tampones fosfato no son compatibles (ej. glicerol fosfato) y pueden interferir con el análisis, dependiendo de su concentración, pureza y estabilidad en medio ácido.

Altas concentraciones de agentes reductores pueden anular el color de la sonda resultando en una menor sensibilidad. El β -mercaptoetanol al 0,1% reduce la sensibilidad sobre un 20%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Algunos detergentes pueden usarse a una concentración $\leq 0,1\%$, pero concentraciones superiores pueden generar *background*. Si fuera necesario utilizar una concentración elevada de un detergente, la misma cantidad del mismo se debería añadir al patrón para corregir el *background*.

Los tampones idóneos para fosfatasas generalmente incluyen un agente reductor a bajas concentraciones, un quelante de cationes divalentes y distintos inhibidores de proteasas. Hasta un 1% de detergente (ej. Triton X-100) puede ser usado para analizar proteínas de membrana, si la dilución de la muestra es apropiada.

Se escoge el tampón adecuado dependiendo de si vamos a analizar fosfatasas de membrana o intracelulares.

Este método es compatible con numerosos tampones, agentes reductores, detergente y glicerol.

- **Procesado de las muestras.**

Los lisados celulares y extractos de tejidos suelen contener concentraciones milimolares de fosfato libre que podrían interferir con el análisis. Además, altas concentraciones de ATP pueden incrementar el ruido de fondo y producir fosforilación por contaminación de kinasas. Por ello, se requiere eliminar esos componentes de las muestras utilizando un paso previo de cromatografía de exclusión.

El método de extracción puede influenciar la recuperación de fosfatasas y la presencia de inhibidores de estas enzimas.

- **Sustratos fosforilados.**

El kit para medir la actividad serín/treonín fosfatasa proporciona un fosfopéptido que es reconocido específicamente por la PP2A, la PP2B y la PP2C (no es reconocido por la PP1), y el kit para medir la actividad tirosín fosfatasa proporciona un sustrato general para tirosín fosfatasas.

Otros sustratos naturales de las fosfatasas de interés pueden ser usados. Algunas de estas proteínas vienen purificadas parcialmente de la

MATERIALES Y MÉTODOS

casa comercial, pero usualmente requieren una diálisis para remover los fosfatos libres antes de empezar. En el caso del análisis de la actividad MKP2 y MKP3, se utilizó como sustrato ERK 1/2 fosforilado (Bionova) libre de fosfatos.

- **Inhibidores de fosfatasas.**

Existe una variedad de inhibidores de fosfatasas con espectros de acción distintos que permiten manipular de forma sencilla las condiciones experimentales para inhibir unas fosfatasas u otras de forma más o menos específica. La tabla 8 muestra la acción de varios inhibidores sobre la actividad fosfatasa.

Tabla 8.-Efecto de inhibidores de fosfatasas sobre la actividad de las tirosín fosfatasas (PTPs) y sobre serín/treonín fosfatasas (PPPs). +++++ alta actividad; ++ moderada actividad; - actividad nula.

ENZIMA	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN PRESENCIA DEL INHIBIDOR					
Clase de fosfatasa	Vanadato	NaF	EDTA (Sin Mg ²⁺)	EGTA (Sin Ca ²⁺)	Ácido okadaico	Trifluoroperazina
PTPs	-	++++	++++	++++	++++	++++
PP-2A	++++	-	++++	++++	-	++++
PP-2B	++	-	++++	-	++++	-
PP-2C	++++	-	-	++++	++++	++++

3.13.1. Procedimiento.

- 1.- Se homogeneiza el tejido o el lisado celular a 0-4°C durante 30 s usando 1 g de tejido en 3 ml de tampón de homogeneización.
- 2.- Se centrifugan los homogenados a 100.000 *xg* a 4°C durante 1 h, y recogemos el sobrenadante.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 3.- Se eliminan los fosfatos por cromatografía de exclusión. Los kits proporcionan columnas y resinas de sephadex para realizar este paso.
- 4.- Se determina la concentración de proteínas de las muestras y se prepara una dilución de las muestras, que contenga 50 μg de proteínas a partir de tejido o 35 μg a partir de células en 175 μl de tampón de homogeneización.
- 5.- Se prepara la dilución de la sonda de molibdato. Se añaden 10 μl de la sonda de molibdato para 1 ml de la solución de la sonda.
- 6.- Se prepara el fosfopéptido que se va a utilizar como sustrato. Se prepara el fosfopéptido a una concentración 1 mM con agua libre de fosfatos (proporcionada en el Kit). Por lo general, se usan 5 μl del sustrato reconstituído en 50 μl de reacción (100 μM), dando como resultado una liberación de fosfatos superior a 5 nanomoles.
- 7.- Se construye una curva patrón de fosfatos, diluyendo el estándar de fosfato 1 mM (proporcionado en el kit) en agua libre de fosfatos. Se genera una solución 50 pmol/ μl (50 μM) y se preparan diluciones que contengan 0, 100, 200, 500, 1000 y 2000 pmol/ μl en 50 μl de tampón de reacción 1X.
- 8.- Se preparan 50 μl de cada punto de la recta patrón en los pocillos de reacción. Se realizan triplicados de cada punto de la recta.
- 9.- Se añaden 10 μl de tampón 5X de la fosfatasa en estudio y 5 μl del fosfopéptido directamente en los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo estrecho (Greiner bio-one), evitando la formación de burbujas. Se realizan triplicados de cada muestra.
- 10.- Atemperar la muestra a temperatura ambiente durante un par de minutos y empezar la reacción añadiendo 35 μl de la dilución de la muestra en el pocillo de reacción.
- 11.- Incubar la reacción durante 15 min.

MATERIALES Y MÉTODOS

12.- Parar la reacción añadiendo 50 μ l de la solución de la sonda de molibdato (1 volumen de reacción). También se añaden 50 μ l de la solución de la sonda en los pocillos de la recta patrón.

13.- Colocar la placa de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 15 min (30 min si hay más de 5 μ g de proteína en la reacción, porque altas concentraciones de proteínas retrasan la aparición del color). Una vez la coloración de la solución se ha completado, el color se mantiene estable durante al menos 2 h.

14.- Leer la densidad óptica de las muestras a 600-630 nm.

3.13.2. Cálculos.

Con la pendiente y la ecuación de la recta obtenidas a partir de los datos de la recta patrón de fosfatos, se intrapolan las concentraciones de fosfatos en las muestras. Dividiendo la concentración de fosfatos por el tiempo de incubación y por la concentración de proteínas obtenemos la actividad.

La actividad se expresa en nmol/min x mg proteína.

3.13.3. Tampones y sustratos utilizados para determinar las actividades MKP 2 y MKP 3.

El sustrato utilizado para determinar las actividades de las MKP 2 y MKP 3 fue ERK 1/2 fosforilado a una concentración de 1 mM disuelto en el siguiente tampón:

- **Tampón de resuspensión de ERK 1/2 fosforilado:**
 - o Tris-HCl 50 mM , pH 7,5
 - o NaCl 150 mM
 - o DTT 0,25 mM
 - o EGTA 0,1 mM
 - o Glicerol 30%

MATERIALES Y MÉTODOS

El tampón de homogeneización para realizar los homogenados a partir de tejido fue el siguiente:

- **Tampón de homogeneización:**
 - o Tris-HCl 50 mM, pH 7,4
 - o NaCl 150 mM
 - o DTT 5 mM
 - o EDTA 2 mM
 - o Tritón X-100 0,1%
 - o Cóctel de inhibidores de proteasas 10 µl/ml.

Lo que diferenció la determinación de las actividades de las dos MKPs fueron los tampones en los que se produjeron las reacciones, que fueron los siguientes:

- **Tampón de reacción MKP 2 (5X)** (Misra-Press y cols., 1995):
 - o Tris 250 mM, pH 7.5
 - o EDTA 5 mM
 - o DTT 50 mM
 - o Ortovanadato sódico 50 µM
 - o NaF 50 mM
- **Tampón de reacción MKP 3 (5X)** (Zhou y cols., 2002) :
 - o MOPS 250 mM, pH 7,0
 - o NaCl₂ 500 mM
 - o EDTA 0,5 mM

MATERIALES Y MÉTODOS

3.13.4. Tampones y sustratos utilizados para determinar la actividad citosólica tirosín fosfatasa.

La actividad tirosín fosfatasa total se determinó en muestras de páncreas de rata centrifugadas a 100.000 *xg*, eliminando así las tirosín fosfatasas de membrana. Se utilizó un sustrato con afinidad por las tirosín fosfatasas. Este sustrato viene proporcionado por el kit de actividad tirosín fosfatasa (Promega), y se trata de un péptido de 1,33 KDa con un residuo de tirosina fosforilado y cuya secuencia es D-A-D-E-(pY)-L-I-P-Q-Q-G.

El tampón de homogeneización para realizar los homogenados a partir de tejido fue el siguiente:

- **Tampón de homogeneización:**

- o Tris-HCl 50 mM, pH 7.4
- o NaCl 150 mM
- o DTT 5 mM
- o EDTA 2 mM
- o Tritón X-100 0,1%
- o Cóctel de inhibidores de proteasas 10 µl/ml.

El tampón de reacción para la actividad citosólica tirosín fosfatasa fue el siguiente:

- **Tampón de reacción PTPs (citosólica) 5X (Jarvis y cols., 2006):**

- o Tris-HCl 100 mM, pH 6,8
- o DTT 50 mM
- o EDTA 5 mM
- o EGTA 5 mM
- o NaF 125 mM

MATERIALES Y MÉTODOS

3.13.5. Tampones y sustratos utilizados para determinar la actividades PP2A, PP2B (calcineurina) y PP2C.

El sustrato utilizado para determinar la actividad de las serín/treonín fosfatasa analizadas fue el mismo en los tres casos. Este sustrato viene proporcionado en el kit para medir la actividad ser/tre fosfatasa (Promega), y es un péptido de 0,75 KDa fosforilado en un residuo de treonina, cuya secuencia es R-R-A-pT-V-A.

El tampón de homogeneización para realizar los homogenados a partir de tejido fue el siguiente:

- **Tampón de homogeneización:**

- o Tris-HCl 50 mM, pH 7,4
- o NaCl 150 mM
- o DTT 5 mM
- o EDTA 2 mM
- o Tritón X-100 0,1%
- o Cóctel de inhibidores de proteasas 10 µl/ml.

Para la determinación de la actividad PP2A *in vitro* se utilizaron 0,2 ml del mismo tampón por cada placa Petri de 21 cm², y las células se recogieron con un rascador (*cell scraper*). Después fueron homogeneizadas igual que a partir de tejido.

Al igual que con las MKPs, lo que diferenció la determinación de las actividades de las ser/tre fosfatasa fueron los tampones de reacción, que fueron los siguientes:

- **Tampón de reacción PP2A 5X:**

- o Imidazol 250 mM, pH 7.2
- o EGTA 1 mM
- o β-mercaptoetanol 0.1%

MATERIALES Y MÉTODOS

- o BSA 0.5 mg/ml
- **Tampón de reacción PP2B 5X:**
 - o Imidazol 250 mM, pH 7,2
 - o EGTA 1mM
 - o MgCl₂ 50 mM
 - o NiCl₂ 5 mM
 - o calmodulin 25 µg/ml
- **Tampón de reacción PP2C 5X:**
 - o Imidazol 250 mM, pH 7,2
 - o EGTA 1 mM
 - o MgCl₂ 25 mM
 - o β-mercaptoetanol 0.1%
 - o BSA 0.5 mg/ml

Estos tampones fueron utilizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.14. Determinación de la concentración de AMPc, *in vitro*.

La concentración de AMP cíclico (AMPc) en las células AR42J se determinó con un kit (cayman), realizando 6 réplicas del experimento.

El principio de este kit, se basa en la competitividad entre el AMPc libre y el AMPc conjugado a la acetilcolinesterasa (AChE) por su unión a un número limitado de anticuerpos de conejo específicos contra el AMPc, que serán reconocidos a su vez por anticuerpos secundarios anti Ig G de

MATERIALES Y MÉTODOS

conejo. Mientras que la concentración del AMPc conjugado es constante, la del AMPc libre varía, por lo tanto, la cantidad de AMPc conjugado capaz de unirse a los anticuerpos será inversamente proporcional a la concentración de AMPc libre en el pocillo. Para determinar la cantidad del AMPc-AChE unido a los anticuerpos, se hacen varios lavados para eliminar los que no se han unido, y luego se añade un reactivo que contiene un sustrato de la AChE que producirá un color amarillo que se puede cuantificar por espectrofotometría. La intensidad del color determinada espectrofotométricamente es proporcional a la concentración de AMPc-AChE e inversamente proporcional a la de AMPc.

La placa de 96 pocillos proporcionada en el kit es especial, ya que en el fondo de los pocillos va fijado el anticuerpo secundario.

La solución que contiene el sustrato para la AChE (reactivo de Ellman) contiene acetilcolina y ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico. La hidrólisis de la acetilcolina por la AChE produce tiocolina. La reacción no enzimática de la tiocolina con el ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico produce ácido 5-tio-2-nitrobenzoico que absorbe fuertemente a 412 nm.

La enzima es altamente estable en las condiciones del ensayo y presenta actividad en un rango de pH entre 5-10. La AChE sigue siendo activa en tampones usados habitualmente y además como el revelado se realiza por saturación, no se necesita parar la reacción y el color es estable en el tiempo.

El límite de detección de este kit está en 0.1 pmol/ml para muestras acetiladas, y de 3 pmol para muestras no acetiladas. Por eso, si se espera obtener una concentración baja de AMPc es conveniente acetilar primeramente las muestras.

3.14.1. Procesado de las muestras.

Para la determinación del AMPc en células AR42J, se siguieron las instrucciones del fabricante. La extracción del cultivo celular para determinar el AMPc se realizó de la manera siguiente:

- 1.- Se eliminó el medio de cultivo de las placas.
- 2.- Se lavaron las placas con PBS, y se retiró posteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 3.- Se añadieron 0,6 ml de HCl 0,1 M por cada placa de 21 cm².
- 4.- Se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min.
- 5.- Se recogieron los lisados celulares con un rascador (*cell scraper*).
- 6.- Se transfirieron los lisados a tubos eppendorf y se resuspendieron por pipeteo.
- 7.- Se centrifugaron a 1000 *xg* durante 10 min.
- 8.- Se recogió el sobrenadante y se determinó la cantidad de proteínas por Lowry.
- 9.- Se preparó una recta patrón con el estándar de AMPc con concentraciones de 750, 250, 83,3, 27,8, 9,3, 3,1, 0,3 y 0 pmol/ml de AMPc.
- 10.- Se acetilaron tanto las muestras como los estándares, añadiendo 100 µl de KOH 4 M y 25 µl de anhidro acético a 500 µl de muestra o de estándar, se agitaron 15 s, se añadieron otros 25 µl de KOH 4 M y se volvieron a agitar de nuevo.

3.14.2. Procedimiento.

La determinación de la concentración de AMPc se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante:

- 1.- Se preparan las distintas soluciones necesarias para el ensayo de acuerdo a las instrucciones del kit, tampón de inmunoensayo enzimático (EIA: solución de fosfato 1 M, NaCl 4 M, EDTA 10 mM, BSA 1% y azida sódica 0.1%), tampón de lavado, solución AMPc-AChE, solución anticuerpo anti AMPc, y estándar de AMPc). Se debe utilizar en todo momento agua ultrapura.
- 2.- Se preparan triplicados de 50 µl de diluciones de las muestras que contengan 10 µg de proteína. Para las diluciones se utiliza el tampón EIA del kit.
- 3.- Se preparan triplicados con 50 µl de los estándares.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 4.- Se les añade 50 μ l de la solución del conjugado AMPc-AChE y 50 μ l del anticuerpo anti AMPc.
- 5.- También se preparan triplicados de las siguientes condiciones para poder realizar la determinación con exactitud como:
 - o Blanco: No se les añade ningún reactivo antes del revelado.
 - o Uniones no específicas (NSB): Se añaden 100 μ l del tampón EIA y 50 μ l de la solución del conjugado AMPc-AChE. No se les añade anticuerpo anti AMPc.
 - o Máxima Unión (B_0): Se ponen 50 μ l del tampón EIA, 50 μ l de la solución del conjugado AMPc-AChE y 50 μ l del anticuerpo anti AMPc.
- 6.- Se recubre la placa y se incuba durante 18 h a 4°C.
- 7.- Se elimina el líquido de la reacción y se lava la placa 5 veces con el tampón de lavado.
- 8.- Se añaden 200 μ l de la solución de revelado (reactivo de Ellman). la solución de revelado se debe preparar inmediatamente antes de usar.
- 9.- Se incuba la solución durante 90-120 min y se mide la absorbancia a 405-420 nm.
- 10.- Para que la lectura sea correcta, la absorbancia de los pocillos B_0 (restando el blanco) debe ser $\geq 0,3$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 9.-Resumen de la adición de los distintos componentes de reacción en la placa del kit para la detreterminaciúon de la concentración de AMPc.

Pocillo	Tampón EIA	Std/ muestra	Solución AMPc-AchE	anticuerpo
Blanco	-	-	-	-
TA	-	-	5µl	-
NSB	100µl	-	50µl	-
B ₀	50µl	-	50µl l	50µl
Std/muestra	-	50µl	50µl	50µl

3.14.3. Cálculos.

Se deben realizar las siguientes operaciones:

- o B*₀ (Máxima unión real) = O.D. (B₀) – O.D (NSB)
- o % unión de los estándares.: %

$$B_{std}/B^*_0 = ((O.D. (Std) - O.D. (NSB))/B^*_0) \times 100.$$
- o % unión de las muestras:

$$\% B_{muestra}/B^*_0 = ((O.D. (muestra) - O.D. (NSB))/B^*_0) \times \quad \times 100$$

Se representa una gráfica con las concentraciones de AMPc de los estándares en las ordenadas y el log (% B_{std}/B*₀) en las abscisas.

A partir de la ecuación se calculan las concentraciones de AMPc de las muestras, que se deben expresar como pmol/ml.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.15. Determinación de la viabilidad de las células AR42J mediante el ensayo MTT.

Para determinar la concentración idónea de taurocolato suficiente para inducir señalización sin producir una elevada mortalidad *in vitro*, se realizaron 5 réplicas de un estudio dosis-respuesta de taurocolato en las células AR42J. Se incubaron las células durante 1 h con un gradiente de concentración de taurocolato, que iba desde el 0 hasta el 1%. Al terminar esta incubación se mide la viabilidad celular. El taurocolato se disuelve en medio de cultivo DMEM.

La viabilidad fue determinada por el método MTT, desarrollado en 1983 (Mosman, 1983). Se basa en la reducción metabólica del bromuro difeniltetrazolio (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa para dar un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

3.15.1. Procedimiento.

- 1.- Se prepara una solución stock de MTT 5 mg/ml en PBS y se filtra con un filtro de nylon de 0,45 μm . La solución se puede guardar a -20°C , pero debe protegerse de la luz.
- 2.- Se diluye la solución madre de MTT en medio de cultivo a una concentración final de 0,5 mg/ml.
- 3.- Se retira el medio de cultivo de los pocillos donde están las células (placas de 24 pocillos), y se añade 0,3 ml del medio con el MTT.
- 4.- Se incuban las células con el MTT 3 h a 37°C y 5% CO_2 .

MATERIALES Y MÉTODOS

- 5.- Se elimina el medio volcando la placa (nunca con aspirador) y se deja boca abajo en papel secante durante unos 30 s. No se debe lavar nunca con PBS.
- 6.- Resuspendemos los cristales de formazán formados con DMSO (pipeteando o por agitación manual). Se debe añadir la misma cantidad de DMSO en todos los pocillos. Para placas de 24 pocillos, con 100 µl de DMSO es suficiente.
- 7.- Se recoge el formazán resuspendido con el DMSO y se diluyen con DMSO en una relación 1:5.
- 8.- Medimos la absorbancia (D.O) de las muestras por espectrofotometría a 570 nm y a 690 nm.

3.15.2. Cálculos.

Se resta el valor de D.O (690) al de D.O (570), y se calcula la viabilidad.

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas} \times 100}{\text{DO células control}}$$

3.16. Efecto de la pentoxifilina sobre la fosforilación de ERK 1/2 inducida por taurocolato en células AR42J *in vitro*.

La determinación del efecto de la pentoxifilina sobre la fosforilación de ERK 1/2 se llevo a cabo mediante westerblotting utilizando un anticuerpo específico contra ERK 1/2 fosforilado (véase tabla 3). Se realizaron 3 réplicas del experimento y utilizó una concentración de taurocolato 0,3% y de pentoxifilina 12 mg/L.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados se han expresado como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo en dos pasos. En primer lugar, la media de los diferentes grupos se comparó utilizando el análisis de la varianza. Cuando la comparación global entre grupos fue significativa, la diferencia entre grupos individuales se determinó aplicando la prueba de *Tukey* cuando los grupos tuvieron igual número de muestras y la prueba de *Scheffe* cuando el tamaño de los grupos fue diferente, considerando que las diferencias fueron significativas para una $p < 0,05$ e indicando aquellos análisis que dieron como resultado una $p < 0,01$.

IV-RESULTADOS

RESULTADOS

1. GLUTAMATO CISTEÍNA LIGASA (GCL) Y GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) EN LA PANCREATITIS AGUDA.

1.1. Niveles de GSH en páncreas en el transcurso de la pancreatitis aguda.

En la PA, tanto en la necrótica como en la edematosa, se produjo un descenso rápido de los niveles de GSH (figura 29). En ambos casos, a 1 hora post-inducción, en la PA necrótica estos niveles disminuyen un 64% (29A) y en la PA edematosa un 80% respecto al control no inducido (29B).

A) Pancreatitis necrótica

B) Pancreatitis edematosa

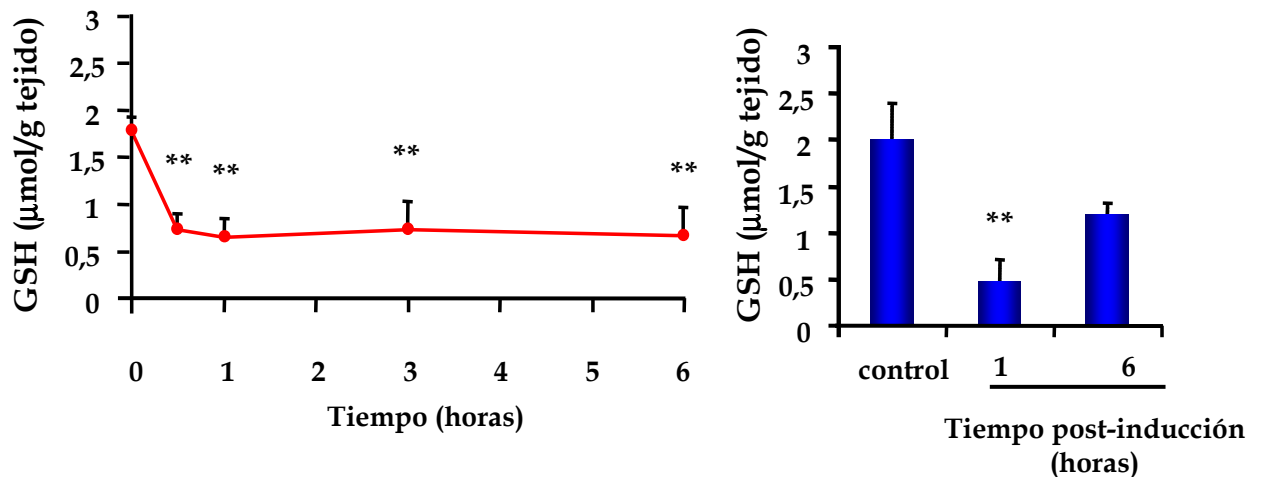


Figura 29.- Evolución de los niveles de glutatión reducido (GSH) en el transcurso de la pancreatitis aguda. Las determinaciones se realizaron por espectrofotometría utilizando el método de Brigelius y colaboradores (1983) en el modelo de PA necrótica (A) y en el modelo de PA edematosa (B). Se utilizaron entre 3-8 ratas por grupo. Las diferencias significativas se muestran como: * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,01$ vs control.

RESULTADOS

A lo largo de las primeras 6 horas, en el caso de la PA necrótica, los niveles de GSH se mantuvieron deplecionados (29A), mientras que en la PA edematosa se observó una recuperación de un 36% en los niveles de GSH a las 6 h post-inducción (29B).

1.2. Expresión proteica de la subunidad catalítica de la GCL durante la pancreatitis aguda.

La GCL, enzima limitante en la síntesis de GSH, está formada por dos subunidades, una pequeña que tiene función reguladora (LS-GCL) y otra grande o pesada con función catalítica (HS-GCL).

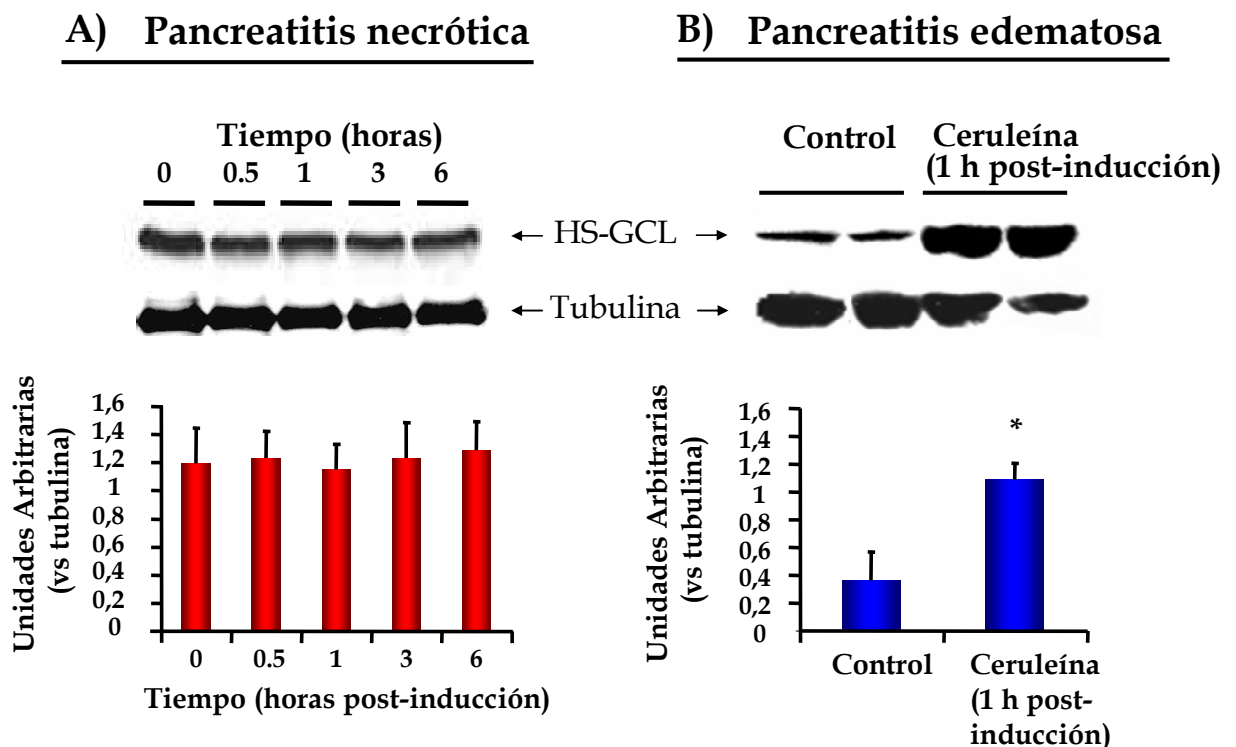


Figura 30.- Niveles proteicos de la subunidad catalítica de la GCL, HS-GCL durante la pancreatitis aguda. *Western blotting* representativo de 3-4 experimentos en los que se utilizó la α -tubulina como control de carga. En la parte de cada imagen se representa la densitometría correspondiente con los valores medios y desviación estandar. Las diferencias significativas se muestran como: * $p < 0,05$ vs control.

RESULTADOS

Los resultados muestran que durante la PA necrótica no hubieron variaciones significativas en los niveles de expresión de la HS-GCL durante las primeras 6 h (figura 30A), mientras que en la PA edematosa si que aumentó significativamente a la hora post-inducción (figura 30B).

1.3. Unión del factor transcripcional c-MYC a los promotores de los genes de la GCL.

Durante la PA edematosa, c-MYC apareció unido a los promotores de la GCL, tanto de la subunidad catalítica (figura 31A), como de la reguladora (figura 31B), 1 h después de la inducción de la pancreatitis.

Pancreatitis edematosa

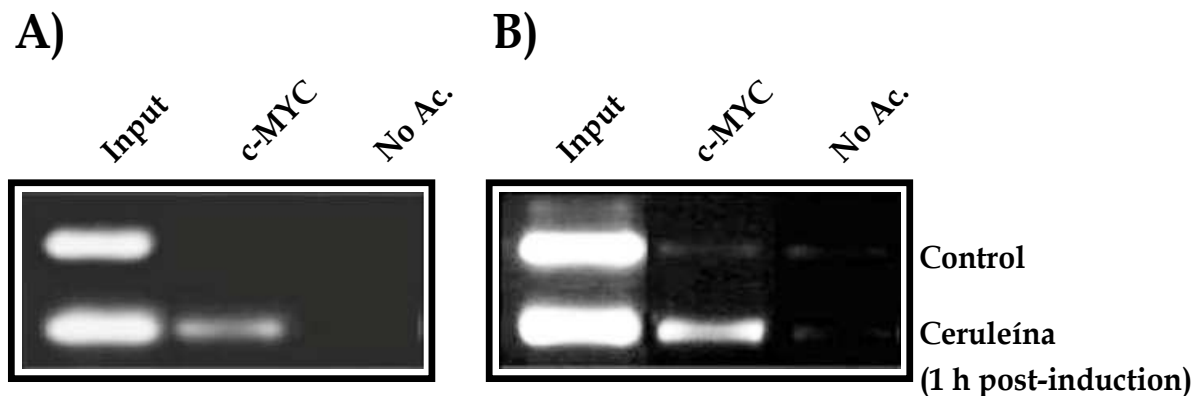


Figura 31.- Unión del factor transcripcional c-MYC a los promotores de la subunidades catalítica (A) y reguladora (B) de la GCL en la pancreatitis aguda edematosa. Análisis de la expresión génica por PCR semicuantitativa con *primers* específicos para los promotores de la subunidades HS-GCL y LS-GCL. Las muestras fueron sometidas a una inmunoprecipitación de cromatina, (ChIP) con un anticuerpo contra c-MYC. Se utilizó un control positivo (Input) y un control negativo del ChIP (No Anticuerpo, No Ac).

RESULTADOS

La proteína c-MYC también apareció unida a los promotores de los genes *hs-gcl* y *ls-gcl*, 1 h después de la inducción de la pancreatitis necrótica (figura 32A y 32B).

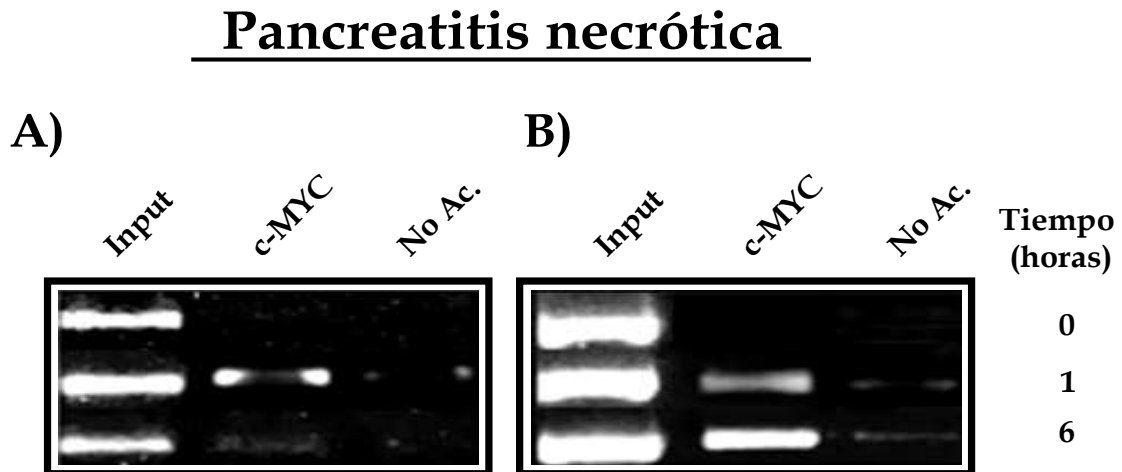


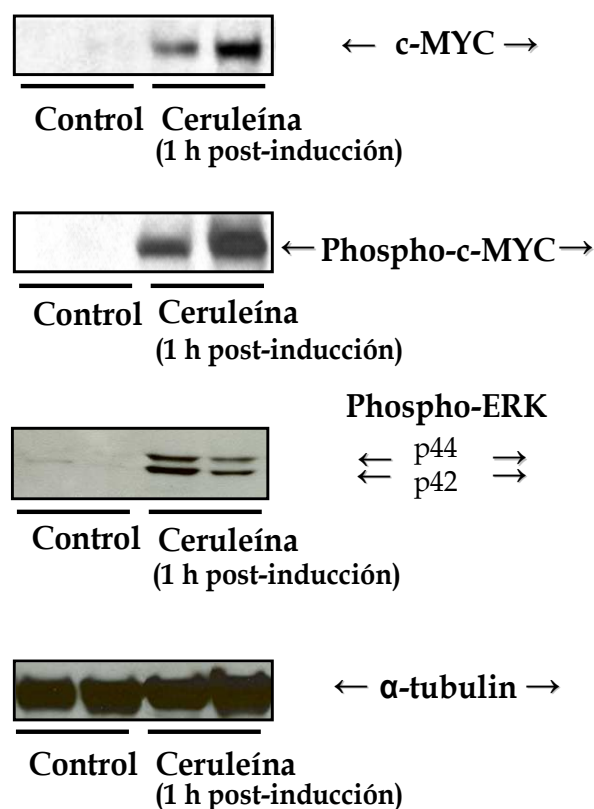
Figura 32.- Unión del factor transcripcional c-MYC a los promotores de la subunidades catalítica (A) y reguladora (B) de la GCL en la pancreatitis aguda necrótica. Análisis de la expresión génica por PCR semicuantitativa con *primers* específicos para los promotores de la subunidades HS-GCL y LS-GCL. Las muestras fueron sometidas a una inmunoprecipitación de cromatina, ChIP con un anticuerpo que reconoce c-MYC. Se utilizó un control positivo (Input) y un control negativo (No Anticuerpo, No Ac).

1.4. Activación de la vía de c-MYC y de la MAP kinasa ERK 1/2 en la pancreatitis aguda.

La síntesis de la GCL está mediada por la vía de señalización de c-MYC y ERK 1/2 en situaciones de estrés (Benassi y cols., 2006). ERK 1/2 y c-MYC aparecieron fosforilados 1 h después de la inducción de la PA edematosa (figura 33A) y también 1 h después de la inducción de la PA necrótica (figura 33B). En el caso de la PA necrótica, el mayor nivel de fosforilación de ERK 1/2 se encuentra a las 0,5 h de 1, mientras que el de c-MYC apareció 1 hora después de la inducción.

RESULTADOS

A) Pancreatitis edematosa



B) Pancreatitis necrótica

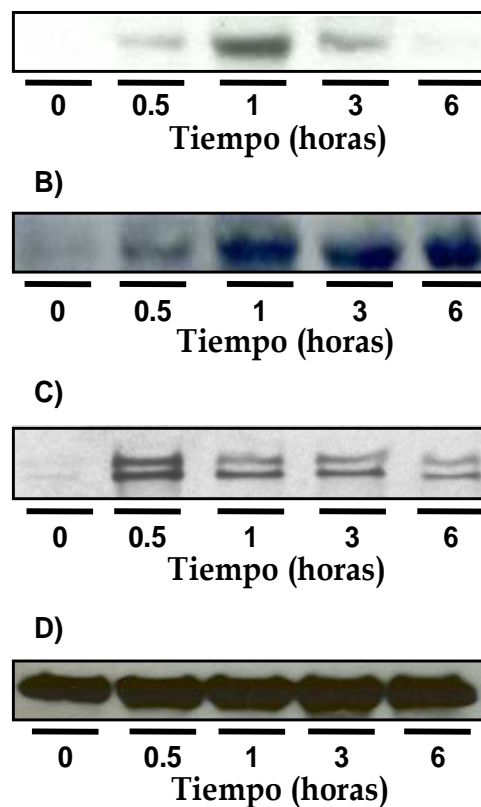


Figura 33.- Niveles de las proteínas c-MYC, c-MYC fosforilado y ERK 1/2 fosforilado en el transcurso de la PA edematosa (A) y PA necrótica (B). Western blotting representativo de 3 y 4 experimentos respectivamente en los que se utilizó la α -tubulina como control de carga.

1.5. Actividad citosólica de la ribonucleasa pancreática en la pancreatitis aguda.

La actividad de la ribonucleasa pancreática se determinó en extractos citosólicos de ratas control, ratas con PA edematosa y ratas con PA necrótica (figura 34). La actividad ribonucleasa en el citosol de

RESULTADOS

páncreas de ratas control y con PA edematosa fue baja, 102 ± 40 y 85 ± 80 unidades kunitz/mg proteína respectivamente, mientras que la actividad aumentó varias veces en el grupo de ratas con PA necrótica, siendo su actividad 750 ± 245 unidades kunitz/ mg proteína. Como control positivo se utilizó ribonucleasa pancreática porcina pura cuya actividad fue de 6.000.000 unidades kunitz/ mg proteína.

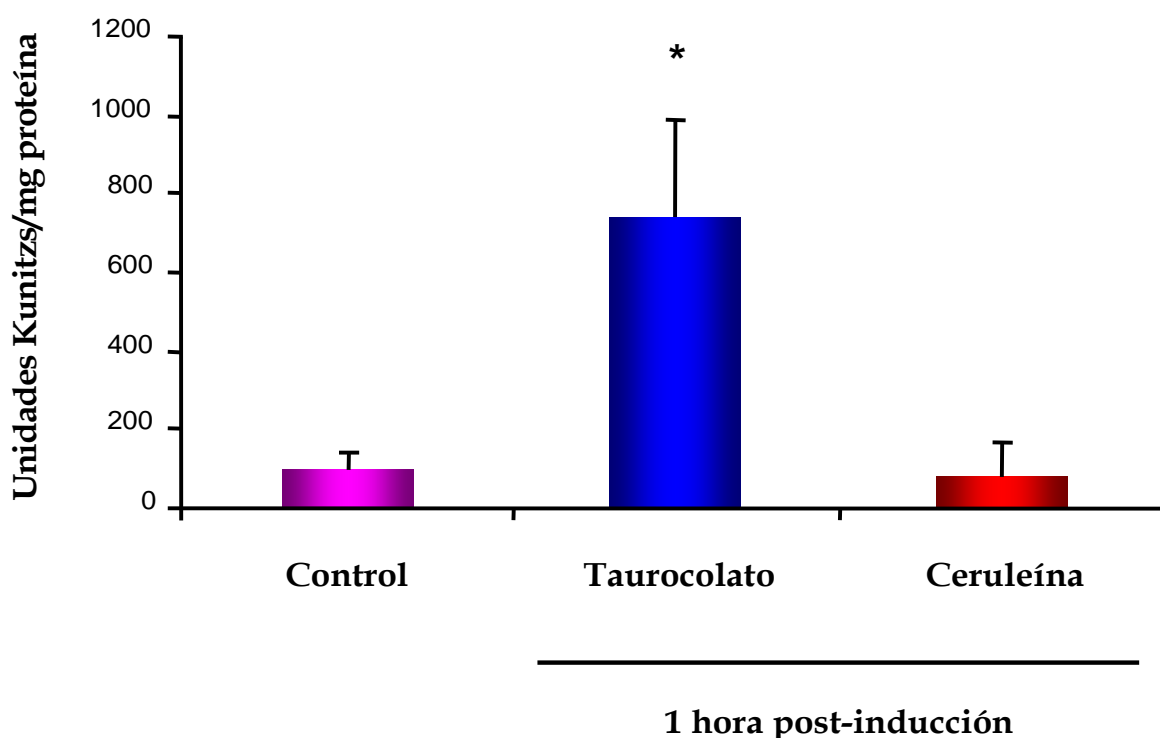


Figura 34.- Actividad citosólica de la ribonucleasa pancreática en la pancreatitis aguda. La actividad se determinó en extractos citosólicos de páncreas de ratas control, ratas con pancreatitis aguda necrótica (taurocolato) y ratas con PA edematosa (ceruleína). Se utilizaron 5 ratas por grupo para realizar las determinaciones. Las diferencias significativas se muestran como: * $p < 0,05$ vs control.

RESULTADOS

2. DEGRADACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN PÁNCREAS EN LA PANCREATITIS AGUDA NECRÓTICA.

2.1. Tasa de degradación de glutatión reducido en homogenados de páncreas de ratas control y con PA necrótica.

La tasa de degradación de GSH se obtuvo a partir de homogenados de páncreas de ratas control y ratas con PA necrótica incubados con GSH exógeno 2 mM, en presencia y ausencia de AEBSF 1 mM.

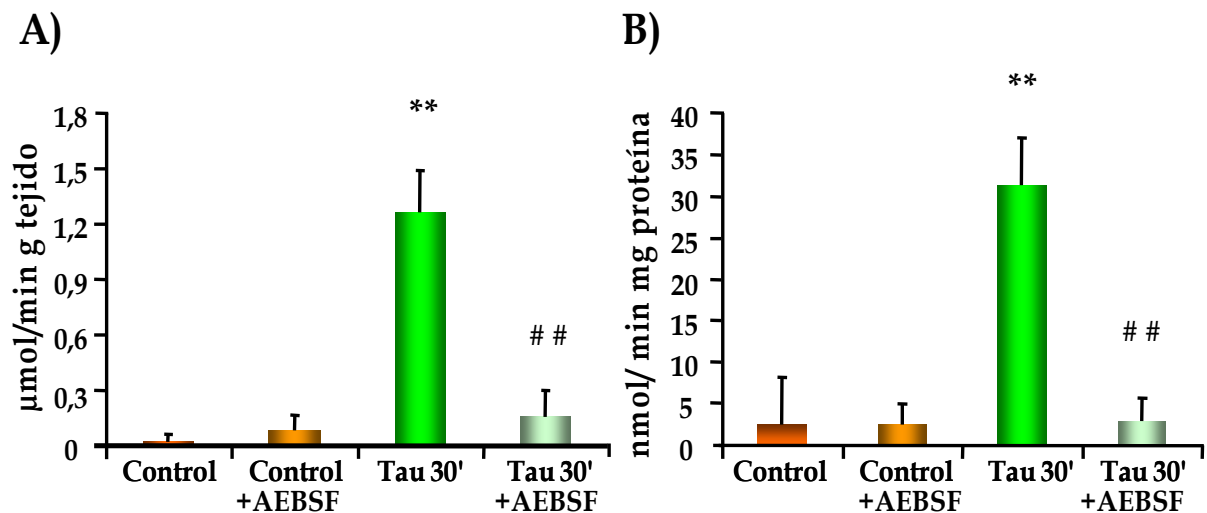


Figura 35.- Tasa de degradación de glutatión reducido en homogenados de páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, en presencia y ausencia de AEBSF. La tasa aparece expresada en $\mu\text{mol}/\text{minuto} \times \text{g}$ de tejido (A) y en $\text{nmol}/\text{minuto} \times \text{mg}$ de proteína (B). Se utilizaron un total de 6 ratas por cada condición. La diferencia estadística se expresa como: ** $p < 0,01$ vs. control, y ##; $p < 0,01$ vs. taurocolato.

La tasa de degradación de GSH del grupo con PA necrótica fue mucho mayor que la tasa de los grupos controles, y el AEBSF la prevenía significativamente (figura 35). Los valores obtenidos fueron (Grupo) control: $0,02 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $2,5 \pm 5,7 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; control +

RESULTADOS

AEBSF: $0,09 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{min g tejido}$; $2,6 \pm 5,4 \text{ nmol}/\text{min x mg prote\u00edna}$;
taurocolato: $1,27 \pm 0,23 \mu\text{g}/\text{min x g tejido}$; $31,4 \pm 5,5 \text{ nmol}/\text{min x mg prote\u00edna}$;
taurocolato + AEBSF: $0,16 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{min x g tejido}$; $3,07 \pm 2,69 \text{ nmol}/\text{min x mg prote\u00edna}$.

2.2. Tasas de formaci\u00f3n de glutamato y de ciste\u00edna en homogenados de p\u00e1ncreas de ratas control y con pancreatitis aguda necr\u00f3tica.

Las tasas de formaci\u00f3n de glutamato y de ciste\u00edna fueron obtenidas a partir de los mismos homogenados utilizados para la determinaci\u00f3n de la tasa de degradaci\u00f3n de GSH.

La tasa de formaci\u00f3n de glutamato est\u00e1 en rangos superiores a los de la degradaci\u00f3n de GSH, y fue significativamente mayor en los homogenados de ratas con PA necr\u00f3tica en comparaci\u00f3n a los del grupo control (figura 36).

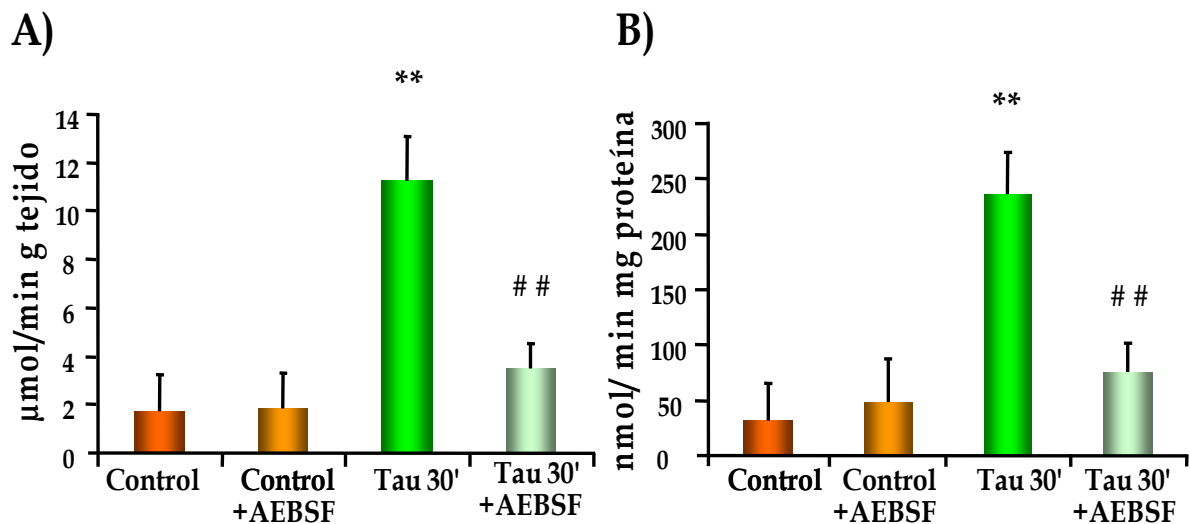


Figura 36.- Tasa de formaci\u00f3n de glutamato en homogenados p\u00e1ncreas de ratas control y con pancreatitis necr\u00f3tica, en presencia o ausencia de AEBSF. La tasa aparece expresada en $\mu\text{mol}/\text{minuto x g}$ de tejido (A) y en $\text{nmol}/\text{min x mg}$ de prote\u00edna (B). Se utilizaron un total de 6 ratas por cada condici\u00f3n. La diferencia estad\u00edstica se expresa como: ** $p < 0,01$ vs. control y ## $p < 0,01$ vs. taurocolato.

RESULTADOS

El AEBSF no tuvo ningún efecto sobre la formación de glutamato en los controles, pero previno de manera significativa la formación de glutamato en el grupo con PA necrótica (figura 36). Los valores obtenidos fueron (Grupo) control: $1,7 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $34,4 \pm 30,8 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; control + AEBSF: $1,8 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $48,8 \pm 38,5 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; taurocolato: $11,26 \pm 1,8 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $235,6 \pm 38,2 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; taurocolato + AEBSF: $3,5 \pm 1,04 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $76,2 \pm 25,7 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína.

La tasa de formación de cisteína en homogenados de rata presenta unos valores que aparecen en el mismo rango que la tasa de degradación de GSH. Además, en el caso de las ratas con PA necrótica la tasa de formación de cisteína fue significativamente mayor respecto a los del grupo control, en los cuales la tasa estimada fue muy baja (figura 37).

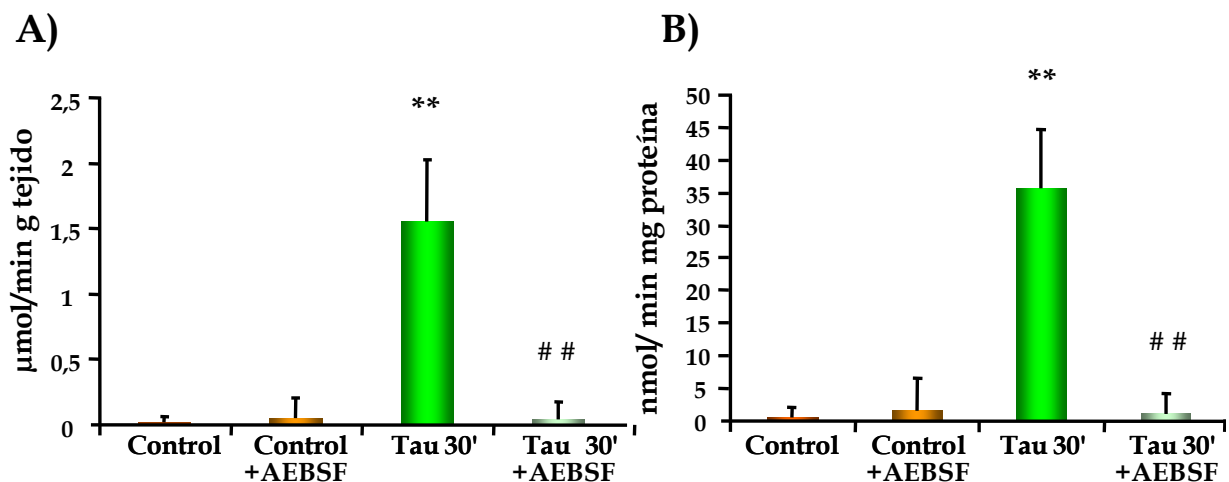


Figura 37.- Tasa de formación de cisteína en homogenados de páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, con y sin AEBSF. La tasa aparece expresada en $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ de tejido (A) y en $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ de proteína (B). Se utilizaron un total de 6 ratas por cada condición. La diferencia estadística se expresa como: ** $p < 0,01$ vs. control y ## $p < 0,01$ vs. taurocolato.

La tasa de formación de cisteína del grupo con PA necrótica se previene totalmente en presencia del AEBSF (figura 37). Los valores obtenidos fueron (Grupo) control: $0,02 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $1,6 \pm 5 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; control + AEBSF: $0,05 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido;

RESULTADOS

1,61 ± 4,5 nmol/min x mg proteína; taurocolato: 1,56 ± 0,4 µg/min x g tejido; 36,7 ± 9 nmol/min x mg proteína; taurocolato + AEBSF: 0,04 ± 0,1 µg/min x g tejido; 1,1 ± 3,2 nmol/min x mg proteína.

2.3. Actividad de la γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT) en homogenados de páncreas. Efecto del AEBSF y la acivicina y de la ultracentrifugación a 200.000 *xg*.

Se determinó la actividad de la γ -GT en los homogenados de páncreas de rata en los que se había estimado la degradación de GSH y la formación de glutamato y de cisteína. Los resultados mostraron que todos presentaban actividad γ -GT, no sólo en los de ratas con PA necrótica sino también en los de ratas control, siendo la actividad media de 135 ± 28 nmol/min x mg proteínas y 141 ± 34 nmol/min x mg proteínas respectivamente.

Por lo tanto los siguientes experimentos se realizaron con el propósito de comprobar si la γ -GT era la responsable de la degradación de GSH detectada en los homogenados de páncreas de ratas con PA necrótica.

Para ello tomaron los cinco homogenados de páncreas con la actividad más cercana a la media y se incubaron con un gradiente de concentración de acivicina, un inhibidor específico de la γ -GT. Ese gradiente cubría un rango de 0 a 5 mM. También se incubaron los homogenados en presencia de AEBSF 1 y 5 mM para ver el efecto del AEBSF sobre la actividad γ -GT.

La actividad de la γ -GT fue sensible al aumento de concentración de acivicina, disminuyendo su actividad un 50%-70% con concentraciones de acivicina que comprenden entre 0,25 y 5 mM, mientras que el AEBSF no afectó de manera significativa a su actividad (figura 38).

RESULTADOS

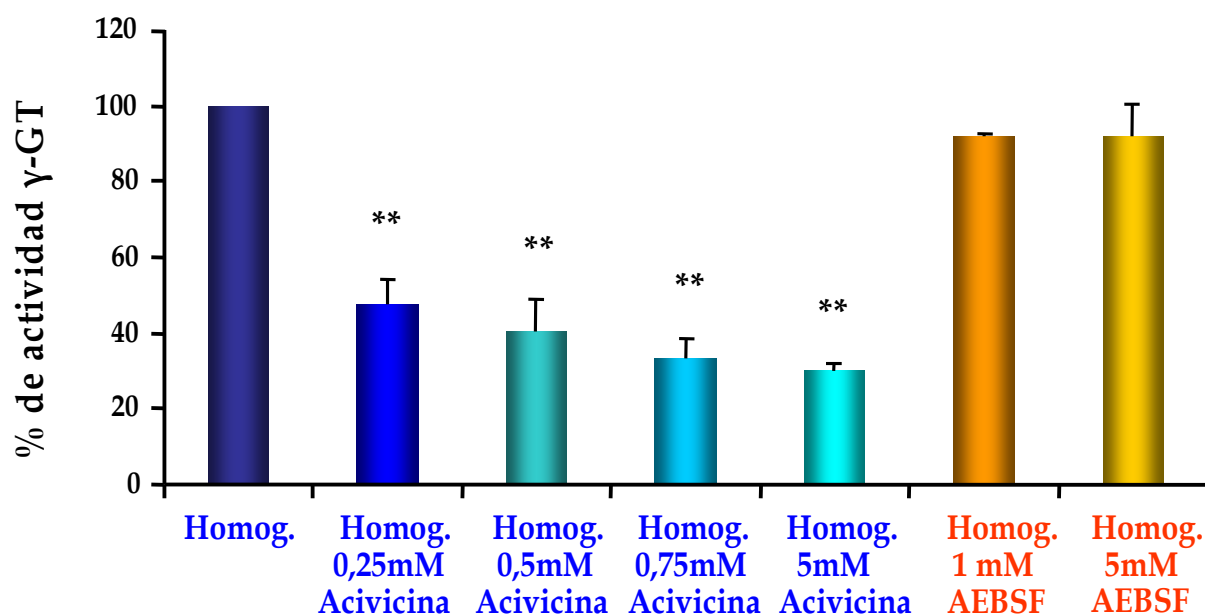


Figura 38.- Actividad de la γ -glutamyl transpeptidasa en homogenados de páncreas de rata. Los homogenados se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de acivicina de 0,25, 0,5, 0,75 y 5 mM y en presencia de AEBSF 1 y 5 mM. Se utilizaron un total de 5 homogenados de páncreas de rata. La diferencia estadística, se expresa como: ** $p < 0,01$ vs. control.

Otra característica que observamos en la determinación de las actividades enzimáticas en estudio, es que las condiciones idóneas para la actividad γ -GT (tampón Tris 0,1 M, pH 8,25) difieren de las utilizadas para la tasa de degradación de GSH (tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,4). Por consiguiente, examinamos la actividad γ -GT en tampón fosfato 0,1 M y pH 7,4 para determinar si la γ -GT es activa en esas condiciones.

No se detectó actividad alguna de la γ -GT en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, contrastando con la actividad de los controles positivos, homogenados sonicados y centrifugados a 3000 xg , donde la actividad γ -GT determinada en Tris 0,1 M pH 8,25 era de un orden sustancialmente superior incluso a la actividad γ -GT detectada en los homogenados (tabla 10).

RESULTADOS

Control positivo: Homogenados de páncreas sonicados y centrifugados a 3000 <i>xg</i> . Condiciones actividad γ-GT: Tampón Tris 0,1 M pH 8,25.	596 \pm 37 nmol/min \times mg prot
Homogenados con acivicina 10 μM centrifugados a 13.000 <i>xg</i>. Condiciones tasa de degradación de GSH: Tampón fosfato 0,1 M pH 7,4.	N.D
Homogenados con acivicina 10 μM centrifugados a 200.000 <i>xg</i>. Condiciones tasa de degradación de GSH: Tampón fosfato 0,1 M pH 7,4.	N.D

Tabla 10.- Actividad de la γ -GT en las condiciones óptimas para la detección de la tasa de degradación de GSH. Se determinó la actividad γ -GT media de 3 homogenados de páncreas de rata (C+) para la actividad γ -GT y de los mismos homogenados de páncreas de rata usando como solución para la reacción, tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 en las condiciones que se indica. Los datos están expresados en nmol/min mg proteína. N.D: actividad no detectable.

A pesar de que parece poco probable que la γ -GT sea la responsable directo de la depleción de GSH en los homogenados de páncreas de ratas con PA necrótica, se decidió eliminar su interferencia de las muestras para realizar los futuros experimentos preparando extractos citosólicos a partir de páncreas de rata.

La figura 39 representa la determinación de la actividad γ -GT en los controles positivos (sonicados) y negativos (ultracentrifugados a 200.000 *xg*) incubados con concentraciones de acivicina 0, 0,25 y 0,5 mM. El resultado de este ensayo confirmó que en los controles positivos la actividad γ -GT disminuye significativamente al aumentar la concentración de acivicina, y en los controles negativos la centrifugación a 200.000 *xg* eliminó por completo la actividad γ -GT.

RESULTADOS

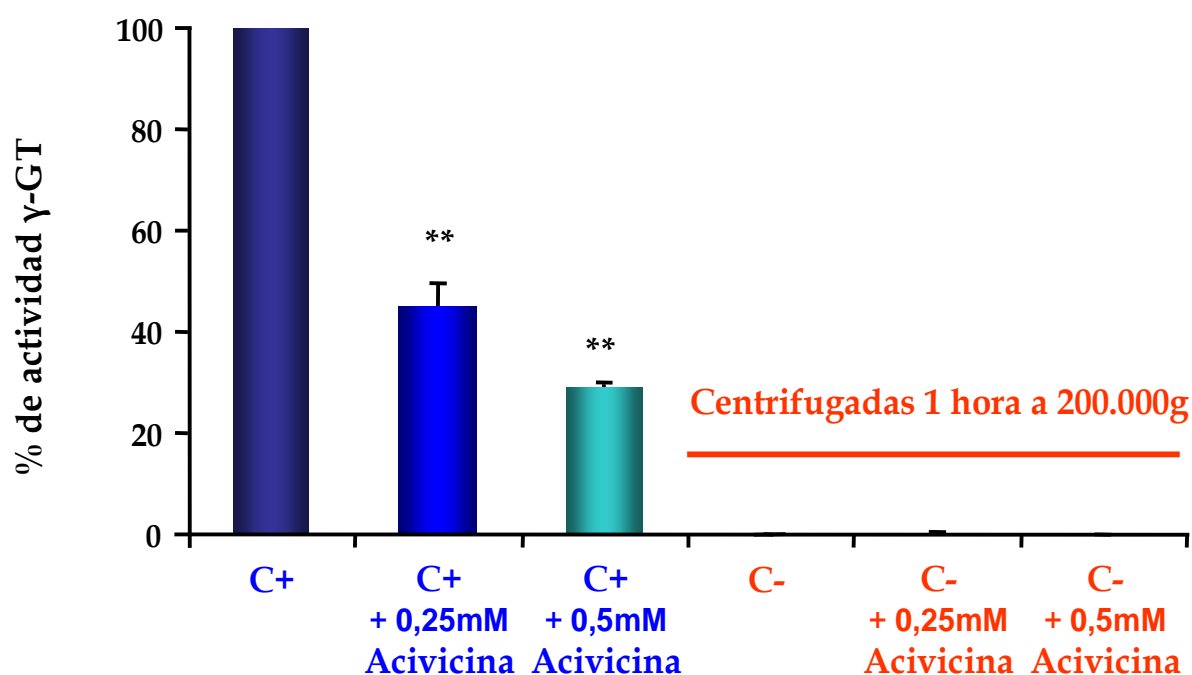


Figura 39.- Eliminación de la actividad de la γ -glutamyl transpeptidasa en homogenados de páncreas de rata. Se prepararon controles positivos para la actividad γ -GT (homogenados sonicados y centrifugados a 3000 \times g) y controles negativos (homogenados ultracentrifugados 1 h a 200.000 \times g) incubados en presencia de concentraciones de acivicina de 0, 0,25 y 0,5 mM. Se utilizaron un total de 5 homogenados de páncreas de rata y se prepararon en las condiciones óptimas para la determinación de la enzima (tampón: Tris pH 8,25; sustratos: γ -glutamyl-4-nitroanilida y glicilglicina). La diferencia estadística se expresa como: * $p < 0,05$ vs. control y ** $p < 0,01$ vs. control.

2.4. Tasa de degradación de glutatión reducido en extractos citosólicos de páncreas de ratas control y de ratas con PA necrótica.

La tasa de degradación de GSH fue determinada en extractos citosólicos centrifugados a 200.000 \times g con una concentración de acivicina de 0,25 mM en el tampón de homogeneización. Esta tasa presentó el mismo perfil que en el caso de los homogenados, es decir, en los controles se observó una actividad de degradación de GSH relativamente baja,

RESULTADOS

mientras que en los extractos de páncreas de ratas con PA necrótica se observó un aumento significativo de la tasa, prevenido en presencia del AEBSF (figura 40).

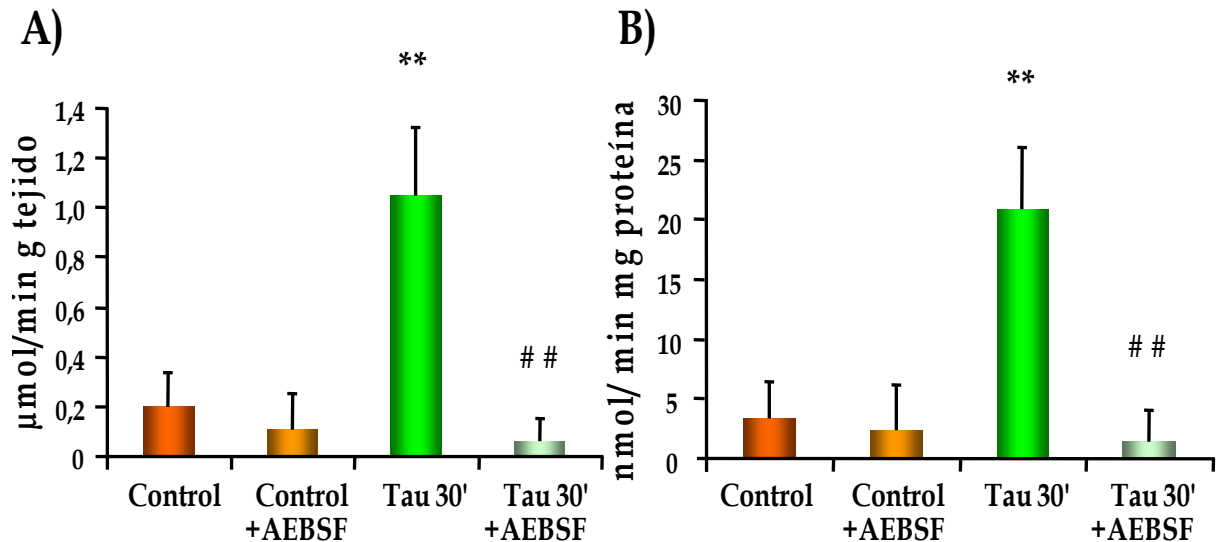


Figura 40.- Tasa de degradación de glutatión reducido en extractos citosólicos de páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, con y sin AEBSF. La tasa aparece expresada en $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ de tejido (A) y en $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ de proteína (B). Se utilizaron un total de 5 ratas por cada condición. La diferencia estadística se expresa como: ** $p < 0,01$ vs. control y ## $p < 0,01$ vs. taurocolato.

Los valores de las tasas de degradación de GSH correspondientes a los extractos citosólicos están en el rango de las tasas obtenidas en los homogenados (figura 40). Los valores obtenidos fueron (Grupo) control: $0,19 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $3,4 \pm 3 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; control + AEBSF: $0,11 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $2,4 \pm 3,7 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; taurocolato: $1,05 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $21 \pm 5 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína); taurocolato + AEBSF: $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $1,5 \pm 2,6 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína.

También se determinó la tasa de degradación de GSH endógeno durante la PA necrótica. Se incubaron otros extractos citosólicos de páncreas de ratas control y ratas con PA necrótica sin adición de GSH exógeno, en presencia y ausencia de AEBSF. Como control positivo se

RESULTADOS

prepararon los mismos extractos añadiéndoles GSH exógeno 2mM. La determinación se realizó del mismo modo que en los apartados anteriores.

Como se puede observar en la figura 41, sí que es posible detectar la tasa de degradación de GSH endógeno en los extractos citosólicos y además la prevención producida por el AEBSF también fue significativa.

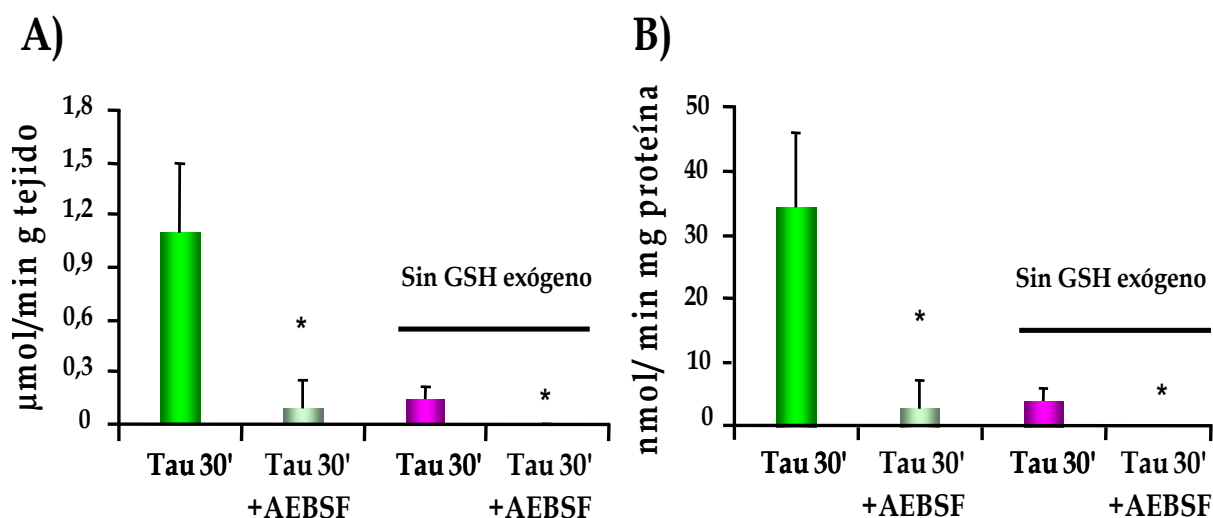


Figura 41.- Tasa de degradación de glutatión reducido endógeno en extractos citosólicos de páncreas de ratas con pancreatitis necrótica, en presencia y ausencia de AEBSF y GSH exógeno. La tasa aparece expresada en $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ de tejido (A) y en $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ de proteína (B). Se utilizaron un total de 5 ratas por cada condición. Como referencia se representa también en la gráfica la tasa de degradación de GSH de los mismos extractos citosólicos añadiendo GSH exógeno 2 mM. La diferencia estadística se expresa como: * $p < 0,05$ vs. taurocolato.

El rango de la tasa de degradación de GSH endógeno en los 5 minutos es 8 veces inferior que cuando se les añade GSH exógeno a los extractos citosólicos (figura 41). Los valores obtenidos fueron (Grupo) taurocolato + GSH exógeno: $1,10 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $34,2 \pm 11,9 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; taurocolato + GSH exógeno + AEBSF: $0,09 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $2,7 \pm 4,6 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ x proteína; taurocolato sin GSH exógeno: $0,14 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $4,1 \pm 2,1 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; taurocolato sin GSH exógeno + AEBSF: $0 \pm 0, \mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $0 \pm 0 \text{ nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína.

RESULTADOS

2.5. Tasas de formación de glutamato y cisteína en extractos citosólicos de páncreas de ratas control y con PA necrótica.

Las tasas de formación de glutamato y cisteína se determinaron en los mismos extractos citosólicos en los que se determinó la tasa de degradación de GSH (véase figura 40).

La formación de glutamato fue significativamente mayor en extractos citosólicos de ratas con PA necrótica respecto a los de ratas control, y disminuyó significativamente al incubar los extractos citosólicos de ratas con PA necrótica con el AEBSF (figura 42).

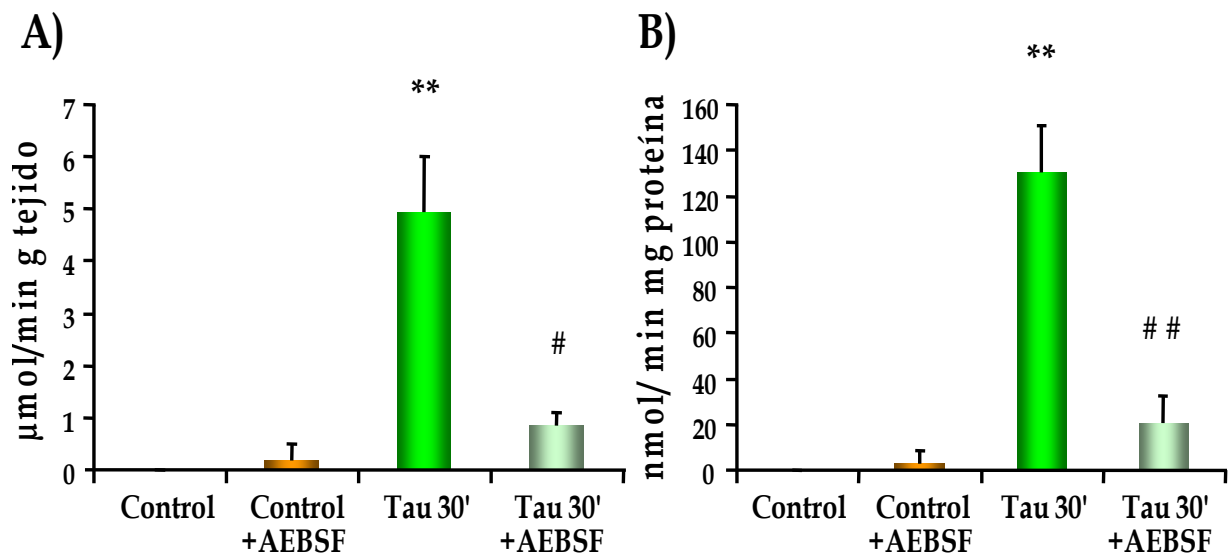


Figura 42.- Tasa de formación de glutamato en extractos citosólicos de páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, presencia y ausencia AEBSF. La tasa aparece expresada en $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ de tejido (A) y en $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ de proteína (B). Se utilizaron un total de 5 ratas por cada condición. La diferencia estadística se expresa como: ** $p < 0,01$ vs. control y ## $p < 0,01$ vs. taurocolato.

El rango de valores de la tasa de formación de glutamato de los extractos citosólicos (figura 42) es inferior al rango obtenido en los homogenados (véase figura 36), aproximadamente a un 50% menos en el

RESULTADOS

grupo de ratas con PA necrótica. Los valores obtenidos fueron (Grupo control: 0 ± 0 $\mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; 0 ± 0 $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; control + AEBSF: $0,18 \pm 0,31$ $\mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $3,1 \pm 5,3$ $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; taurocolato: $4,94 \pm 1,05$ $\mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $130,2 \pm 20,2$ $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; taurocolato + AEBSF: $0,85 \pm 0,24$ $\mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $20,56 \pm 12,25$ $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína.

La formación de cisteína fue significativamente mayor en extractos citosólicos de ratas con PA necrótica respecto a los de ratas control (figura 43).

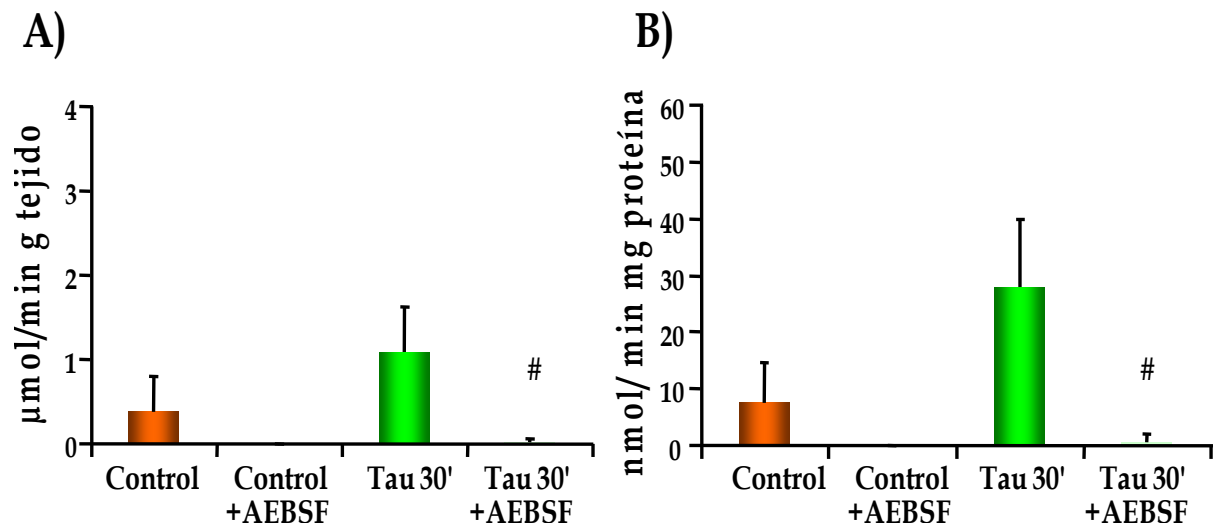


Figura 43.- Tasa de formación de cisteína en extractos citosólicos de páncreas de ratas control y con pancreatitis necrótica, con y sin AEBSF. La tasa aparece expresada en $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ de tejido (A) y en $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ de proteína (B). Se utilizaron un total de 5 ratas por cada condición. La diferencia estadística se expresa como: # $p < 0,05$ vs. taurocolato.

La tasa de formación de cisteína de los extractos citosólicos está dentro del mismo rango de valores que la tasa de degradación de GSH de los mismos extractos y de la tasa de formación de cisteína que presentaron los homogenados (véase figura 37). Los valores obtenidos fueron (Grupo

RESULTADOS

control: $0,41 \pm 0,39$ $\mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $7,54 \pm 7,02$ $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; control + AEBSF: 0 ± 0 , $\mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; 0 ± 0 $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; taurocolato: $1,09 \pm 0,44$ $\mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; 28 ± 13 $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína; taurocolato + AEBSF: $0,02 \pm 0,04$ $\mu\text{g}/\text{min} \times \text{g}$ tejido; $0,69 \pm 1,1$ $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ proteína.

3. IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES ENZIMAS RESPONSABLES DE LA DEGRADACIÓN DE GSH EN LA PANCREATITIS AGUDA NECRÓTICA.

Durante la pancreatitis aguda se produce una disminución de los niveles de GSH que no se debe a la oxidación del mismo a GSSG. Por lo tanto, esa disminución de los niveles de GSH en el citosol de las células pancreáticas es producida por otro mecanismo, entre los que cabe destacar la conjugación del GSH con otras moléculas o su hidrólisis. En base a los resultados anteriormente expuestos, podemos pensar que al menos una parte de esa disminución podría deberse a la hidrólisis del GSH. Habiéndose descartado a la γ -GT como responsable de la degradación de GSH, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido intentar estrechar el círculo de las posibles enzimas implicadas en esta degradación y tratar de averiguar cuál es el mecanismo que produce la disminución del GSH citosólico en etapas tempranas de la pancreatitis.

RESULTADOS

3.1. Análisis de la carboxipeptidasa B y de la tripsina como posibles efectoras de la degradación de GSH en la pancreatitis aguda necrótica.

La carboxipeptidasa B (CPB) y la tripsina son enzimas digestivas y ambas degradan proteínas y péptidos por su extremo carboxiterminal. Aunque en principio actúan sobre residuos básicos, como la lisina y la arginina, y en el caso de la CPB también la histidina, son enzimas potencialmente capaces de producir también la degradación del GSH. Además se sabe que la tripsina es una enzima inhibida por el AEBSF como otras serín peptidasas.

Se determinó la actividad de CPB de páncreas porcino pura (10 unidades de enzima) en tampón fosfato 0,1 M y pH 7,4, comparándola con la actividad en sus condiciones óptimas, que se dan en tampón compuesto por Tris 0,25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,7. Además, se midió su actividad en presencia y en ausencia del AEBSF (figura 44).

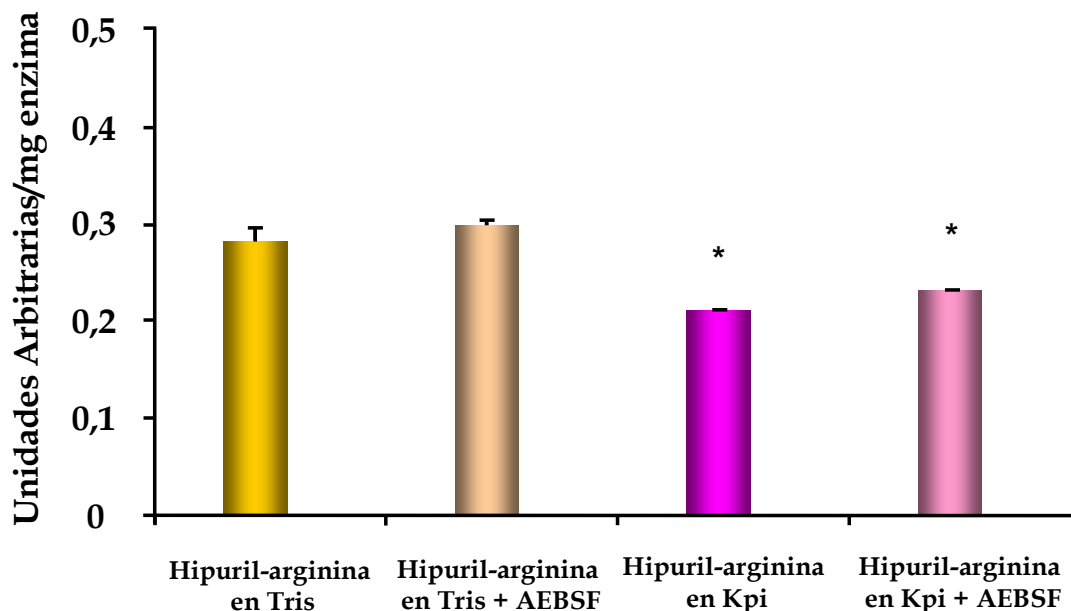


Figura 44.- Actividad de la carboxipeptidasa B pura. Se midió la actividad de la CPB (10 unidades) sobre el sustrato hipuril arginina en las condiciones óptimas (tampón Tris 0,25 mM con NaCl 100 mM pH 7,7) y en condiciones óptimas para la detección de la degradación de glutatión (tampón fosfato 0,1 M pH 7,4). Se realizaron un total de 4 réplicas del experimento. Las diferencias estadísticas se expresan como: * $p < 0,05$ vs. hipuril-arginina en Tris.

RESULTADOS

Aunque se produjo una disminución de la actividad CPB en el tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 respecto al tampón Tris 0,25 mM, NaCl 100 mM pH 7,7, la CPB presentó actividad en ambos tampones y además no se vio afectada por la presencia del AEBSF (figura 44). La actividad CPB expresada en unidades de actividad/ml fue de $0,28 \pm 0,02$ en el tampón Tris, y $0,30 \pm 0,01$ en presencia de AEBSF; su actividad en el tampón fosfato fue de $0,21 \pm 0,002$ y en presencia de AEBSF $0,23 \pm 0,002$ unidades/ml.

En el caso de la tripsina, no hizo falta realizar estas pruebas previas porque la tripsina es activa en tampón fosfato pH 7,5 y 37°C (Murthy y Saxena, 1978). Por tanto, como ambas enzimas son activas en el tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, se decidió determinar la tasa de degradación de GSH producida por 10 unidades de cada enzima en tampón fosfato 0,1 M, con GSH 2 mM y pH 7,4, en ausencia y en presencia del AEBSF.

En la tabla 11 se exponen los resultados de este experimento, donde no se observó hidrólisis alguna de glutatión en ninguna de las condiciones, ni por parte de la tripsina, ni por parte de la CPB.

	nmol/ min x ml
Tasa de degradación de glutatión producida por la carboxipeptidasa B (10 U).	N.D
Tasa de degradación de glutatión producida por la carboxipeptidasa B (10 U) en presencia de AEBSF.	N.D
Tasa de degradación de glutatión producida por la tripsina (10 U).	N.D
Tasa de degradación de glutatión producida por la tripsina (10 U) en presencia de AEBSF.	N.D

Tabla 11.- Determinación de la tasa de degradación de GSH producida por la carboxipeptidasa B y la tripsina. Se realizaron un total de 4 réplicas en un experimento en el que se incubaron soluciones compuestas por 10 unidades de enzima pura carboxipeptidasa B o tripsina en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, con GSH 2mM e incubadas a 37°C. N.D: actividad no detectable.

RESULTADOS

3.2. Purificación de proteínas afines al glutatión y de proteínas afines al AEBSF por cromatografía de afinidad en extractos citosólicos de ratas con pancreatitis aguda. Análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Después de descartar a las tres principales enzimas potencialmente capaces de degradar el GSH, la γ -GT, la tripsina y la CPB, como responsables de la degradación de GSH en el páncreas durante la PA necrótica, el siguiente paso se afrontó en base a las dos características conocidas del mecanismo de degradación de GSH, es decir, la afinidad de la enzima por el GSH y su sensibilidad al AEBSF. Para estos estudios se realizaron sendas cromatografías de afinidad, utilizando columnas que retenían proteínas afines al GSH por un lado, y por otro columnas que retenían proteínas afines al AEBSF-biotinilado.

Se preparó una mezcla de extractos citosólicos de páncreas de rata con PA necrótica. Dos alícuotas se cargaron en columnas de retención de proteínas afines al GSH, y otras dos se incubaron con el AEBSF-biotinilado para posteriormente cargarse en columnas de retención afines a la biotina.

En las tablas 12 y 13 se muestra la identificación de proteínas afines al GSH y al AEBSF-biotinilado respectivamente, presentes en los extractos citosólicos de páncreas de ratas con PA necrótica, por MALDI-TOF.

RESULTADOS

Especie (Rattus Novergicus)	Peso Molecular (Daltons)	Score (>56 Sig.)
✓ Beta-globina	16069	1024
✓ Hemoglobina 1 alfa	15490	587
✓ Glutación-S-transferasa, mu 2	25857	546
✓ Glutación-S-transferasa, pi 2	23652	480
✓ 0 beta-2 globina	16026	457
✓ Gst Isoenzimas M1-2 y M2-1 (Quimera)	25858	413
✓ Albumina	70710	319
✓ Glutación-S-transferasa A5	25360	192
✓ Glutación-S-transferasa B	25873	79
✓ Alfa-globina	15572	62
Especie (Rattus Novergicus)	Peso Molecular (Daltons)	Score (>42 Sig.)
✓ Glutación-S-transferasa Yb-3	25835	428
✓ Glutación-S-transferasa Mu 1	26068	331
✓ Glutación-S-transferasa alpha-3	25360	230
✓ Glutación-S-transferasa alpha-4	25550	141
✓ Glutación-S-transferasa A6	25791	114
✓ Glutarredoxina-1	12156	54

Tabla 12.- Identificación por MALDI-TOF de proteínas afines al GSH presentes en extractos citosólicos de páncreas de ratas con PA necrótica. Se realizó una mezcla de 5 extractos citosólicos de ratas con PA necrótica, se cargaron dos alícuotas en dos columnas cromatográficas de retención de proteínas afines al GSH y se analizaron los eluatos por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Un *score* mayor del indicado significa una alta probabilidad para la presencia real de la proteína identificada en la muestra ($score = 10 \times \log(p)$; $p < 0,05$).

RESULTADOS

Especie (<i>Rattus Novergicus</i>)	Peso Molecular (Daltons)	Score (>35 Sig.)
✓ Albumina sérica (precursor)	70682	5588
✓ Hemoglobina beta	16097	164
✓ Tripsinógeno	15953	164
✓ Ribonucleasa pancreática	14541	50
✓ Murinoglobulina-1 (precursor)	166590	41
✓ <i>AT rich interactive domain 4B</i> (homóloga a Rbp1)	138080	38
✓ L-arginina: glicina amidinotransferasa	48724	36
✓ Isoforma CRA_a (HTRA serín peptidasa 3)	41106	36

Tabla 13.- Identificación por MALDI-TOF de proteínas presentes en extractos citosólicos de páncreas de ratas con PA necrótica afines al AEBSF. Se realizó una mezcla de 5 extractos citosólicos de ratas con PA necrótica, se cargaron en columnas cromatográficas de retención de proteínas afines al AEBSF-biotinilado y se analizaron los eluatos por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Un *score* mayor del indicado significa la presencia real de la proteína identificada en la muestra ($score = 10 \times \log(p)$; $p < 0,05$).

Asimismo, se realizó una electroforesis de proteínas con dos de los eluatos de la cromatografía de afinidad de GSH y uno de AEBSF, y se procedió a la identificación a partir del bandeo proteico.

La figura 45 representa la tinción de plata del gel en el que se realizó la electroforesis de los eluatos de GSH y de AEBSF, con las correspondientes proteínas identificadas. En el caso de los eluatos de AEBSF, sólo se pudieron analizar algunas bandas, porque la gran cantidad de proteínas presentes en el gel hicieron difícil la recogida y separación correcta de las muestras para su análisis.

RESULTADOS

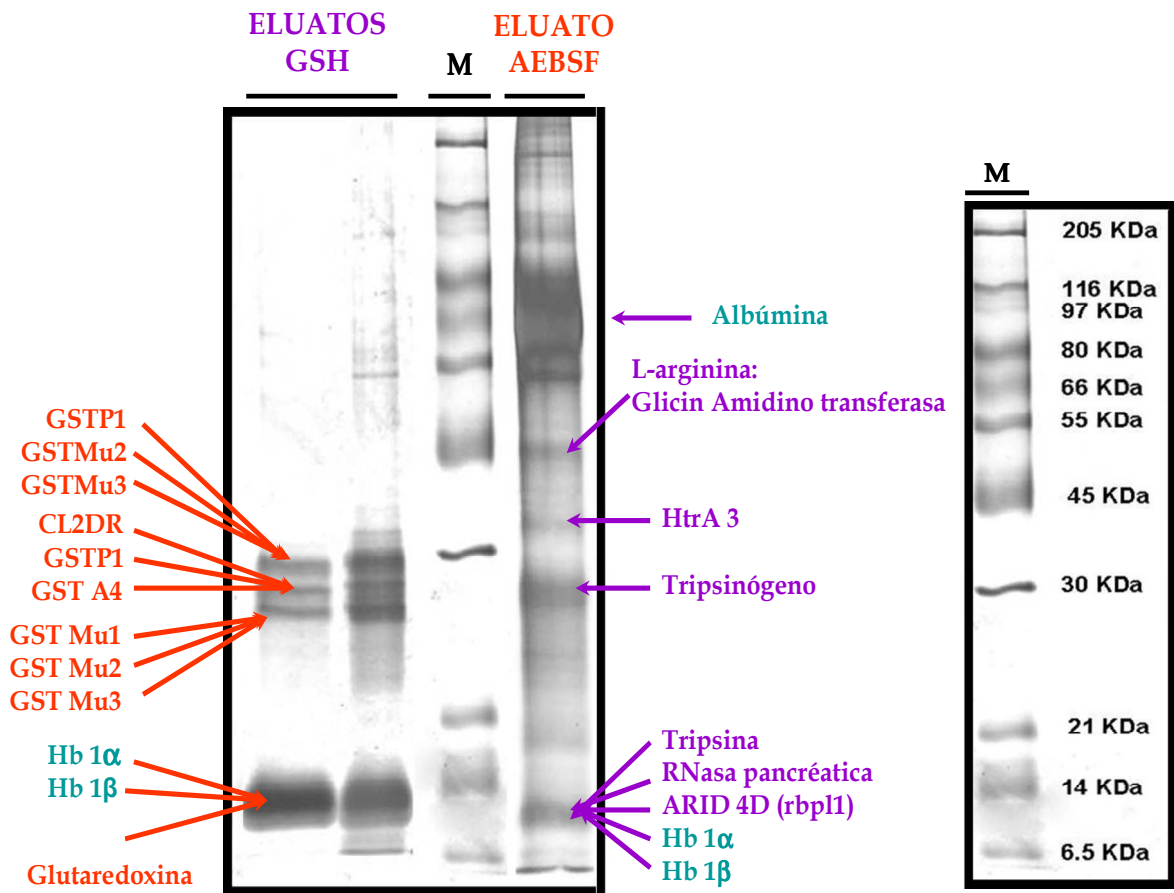


Figura 45.- Separación electroforética e identificación por MALDI-TOF de proteínas afines al GSH y al AEBSF presentes en extractos citosólicos de páncreas de ratas con PA necrótica. Se cargaron los eluatos de las cromatografías de AEBSF y GSH y se analizaron las bandas por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Aquí se indican las proteínas identificadas con un *score* significativo mayor al estimado por el MASCOT. En el caso de GST Mu2 y P1, estas aparecen formando parte de una mezcla de proteínas en dos bandas diferentes. Un *score* significativo indica con alta probabilidad la presencia real de la proteína identificada en la muestra ($score = 10 \times \log(p)$; $p < 0,05$).

Se guardaron alícuotas de los eluatos de proteínas afines al GSH para determinar si presentaban actividad de degradación de GSH. No se pudo hacer lo mismo con los eluatos del AEBSF, ya que la unión del AEBSF a sus sustratos es irreversible, impidiendo tal determinación.

RESULTADOS

Así pues, se determinó la tasa de degradación de GSH en los eluatos de GSH por si hubiera presencia de tal actividad. En los eluatos de proteínas afines al GSH se pudo detectar actividad de degradación de GSH (figura 46).

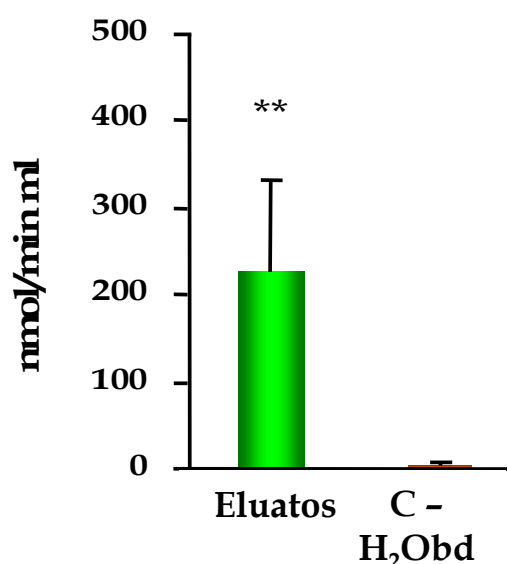


Figura 46.- Tasa de degradación de GSH detectada en eluatos comatográficos de proteínas afines al GSH provenientes de extractos citosólicos de páncreas de ratas con pancreatitis aguda necrótica. La tasa aparece expresada en nmol/min x ml. Se utilizaron un total de 4 alícuotas de los eluatos. La diferencia estadística, se expresa como: ** $p < 0,05$ vs. control negativo (C-).

La tasa de degradación de GSH aparece expresada en nmol/min x ml, porque los métodos habituales para calcular la concentración de proteínas, como el de Lowry o el de Bradford, no resultaron suficientemente sensibles para hacer una medida precisa de la concentración de proteínas.

La tasa de degradación de GSH del control negativo (H₂Obd) fue de $3,7 \pm 5,2$ nmol/min x ml, y la de los eluatos de GSH fue de 227 ± 103 nmol/min x ml (figura 46).

4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE MEK 1/2 Y ACTIVIDADES PROTEÍN FOSFATASA DURANTE LA PANCREATITIS AGUDA. EFECTO DE LA PENTOXIFILINA.

4.1. Activación de la MAP quinasa quinasa MEK 1/2 en la pancreatitis aguda necrótica. Efecto del tratamiento con pentoxifilina sobre la fosforilación de MEK 1/2.

La MAP quinasa ERK 1/2, una de las principales responsables de la amplificación del proceso inflamatorio en el transcurso de la pancreatitis aguda, se activa tempranamente en la PA necrótica (véase figura 33).

La MEK 1/2, quinasa responsable de la fosforilación y activación de ERK 1/2, también se fosforiló tempranamente durante la pancreatitis aguda necrótica experimental, observándose un máximo de fosforilación media hora después de la inducción de la PA necrótica. La activación de MEK 1/2 se mantuvo en el tiempo al menos durante las 6 primeras horas del desarrollo de la pancreatitis (figura 47).

Una vez comprobada la activación de MEK 1/2 en el transcurso de la PA necrótica inducida por taurocolato, se investigó el efecto de la pentoxifilina sobre su fosforilación, fármaco que disminuía la fosforilación de ERK 1/2 (Pereda y cols., 2004).

Sin embargo, la pentoxifilina no produjo ningún efecto en la fosforilación de MEK 1/2 en ninguno de los dos tiempos investigados, a 1 y 6 h post-inducción en la PA necrótica (figura 48).

RESULTADOS

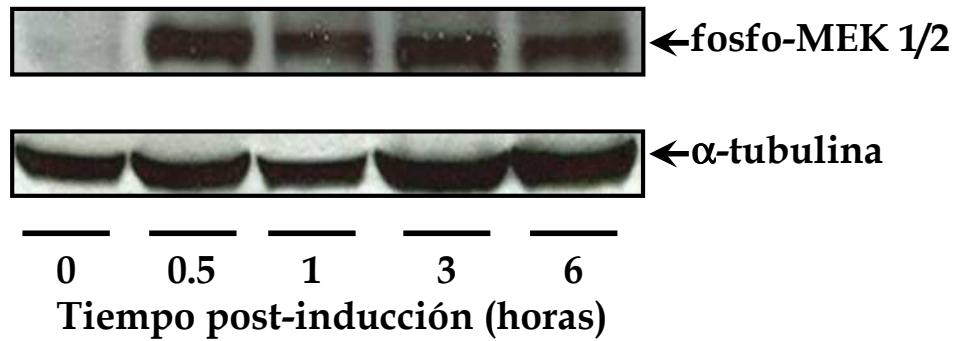


Figura 47. Fosforilación de la MAP quinasa quinasa MEK 1/2 en el transcurso de la PA aguda experimental inducida por taurocolato. La figura muestra un *western blot* representativo contra MEK 1/2 fosforilado y contra la α -tubulina como control de carga, de un total 3 experimentos realizados.

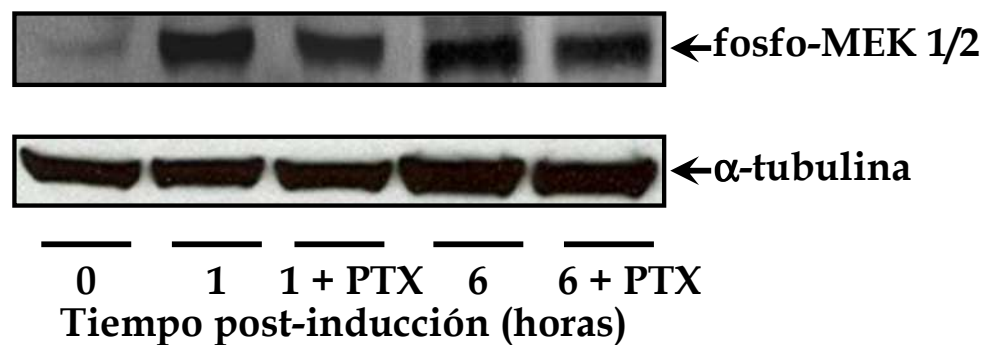


Figura 48. Efecto del tratamiento con pentoxifilina (PTX) sobre la fosforilación de MEK 1/2 en la PA necrótica. La figura muestra un *western blot* representativo contra MEK 1/2 fosforilado y contra la α -tubulina como control de carga, de un total 3 experimentos.

RESULTADOS

4.2. Actividades de las tirosín fosfatasas de especificidad dual, MKP2 y MKP3, y de las tirosín fosfatasas citosólicas en la pancreatitis aguda necrótica.

Algunas proteínas fosfatasas de especificidad dual (DSPs) o MAPK fosfatasas (MKPs) como son la MKP 2 y la MKP 3 han sido relacionadas estrechamente con la regulación de ERK 1/2, (Camps y cols., 2000; Zhou y cols., 2002).

Sin embargo, en nuestros ensayos no se observaron diferencias significativas en la actividad MKP2 en páncreas entre los grupos de ratas control y con pancreatitis. La actividad del grupo control fue de $3,8 \pm 0,7$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína, y la del grupo con PA necrótica fue de $5,2 \pm 1,6$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína (figura 49).

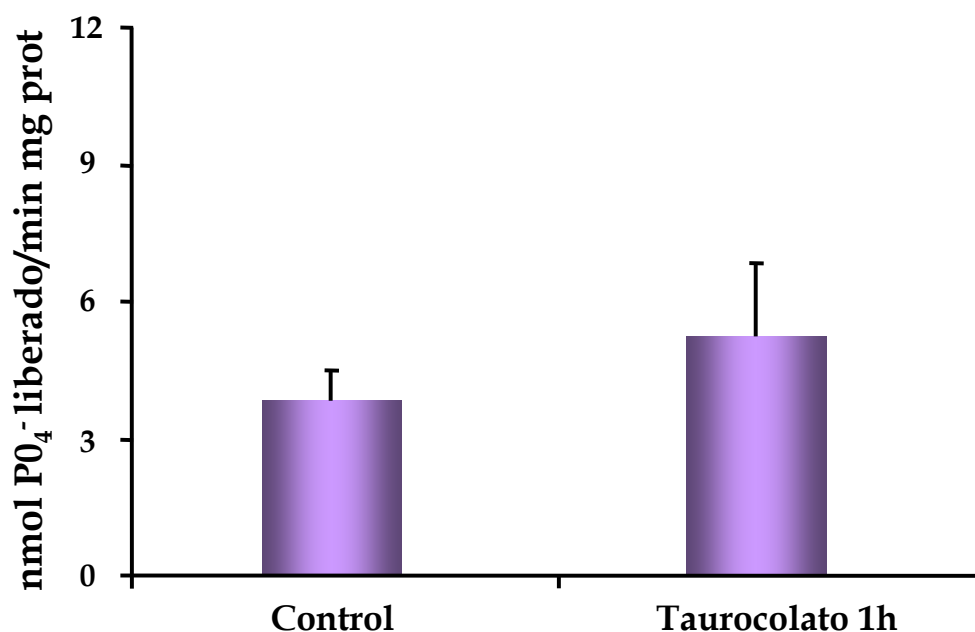


Figura 49.- Actividad de la proteína fosfatasa de especificidad dual MKP2 en la pancreatitis aguda necrótica. La actividad MKP2 se determinó en páncreas de ratas control y de ratas con PA necrótica, utilizándose un total de 3 ratas por grupo. Se utilizó ERK 1/2 fosforilado como sustrato para realizar el ensayo.

RESULTADOS

La actividad de la MKP3 pancreática tampoco se vio afectada en la PA necrótica, obteniéndose como resultados una actividad MKP3 del grupo control de $9 \pm 1,1$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína y la del grupo con PA necrótica de $8,5 \pm 2,1$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína (figura 50).

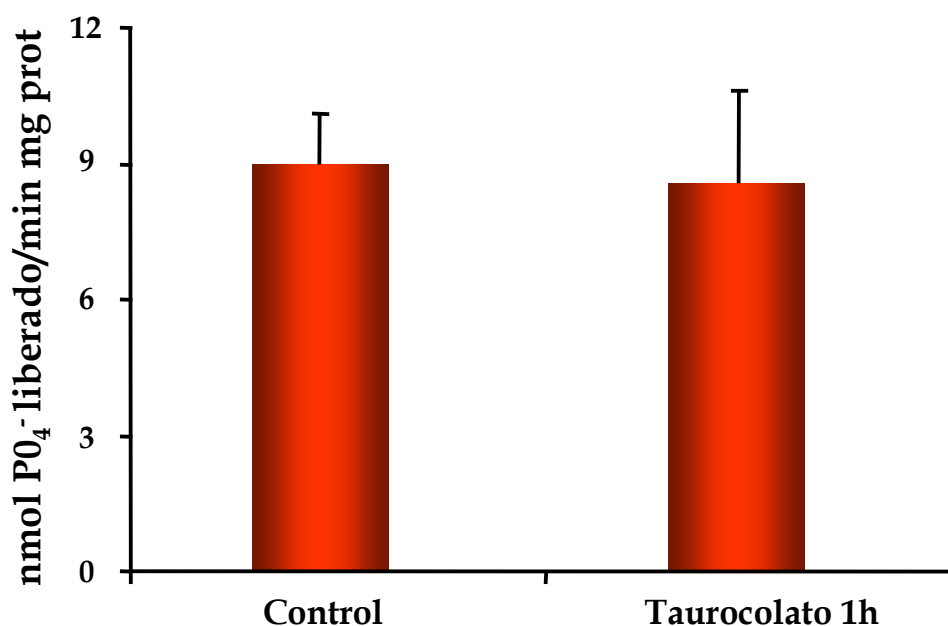


Figura 50.- Actividad de la proteína fosfatasa de especificidad dual MKP3 en la pancreatitis aguda necrótica. La actividad MKP3 se determinó en páncreas de ratas control y de ratas con PA necrótica, utilizándose un total de 3 ratas por grupo. Se utilizó ERK 1/2 fosforilado como sustrato para realizar el ensayo.

Las actividades MKP2 y MKP3 se determinaron por espectrofotometría, utilizando como sustrato ERK 1/2 fosforilado, por lo que la MKP3 parece ser más específica que MKP 2 en la defosforilación de ERK 1/2, lo que concuerda con lo descrito por Camps y colaboradores (2000).

Por otra parte, debido a la numerosa cantidad de enzimas que forman parte de la familia de las tirosín fosfatasas, PTPs, se decidió hacer

RESULTADOS

una aproximación sobre el efecto que la PA necrótica podría producir sobre la actividad de las tirosín fosfatasas citosólicas (véase apartado de métodos).

Para estudiar la actividad de las PTP citosólicas en la evolución de la PA necrótica, se determinó dicha actividad en extractos citosólicos de ratas sacrificadas a 0 (controles), 1, 3 y 6 h después de haber inducido la PA necrótica. Esta actividad se redujo significativamente 1 h después de la inducción de la pancreatitis, y se mantuvo disminuida durante las 3 primeras horas. Posteriormente, a las 6 h después de la inducción de la PA, la actividad había recuperado la normalidad (figura 51). Los valores de la actividad citosólica PTP fueron los siguientes: (Grupo) tiempo 0: $6,49 \pm 0,19$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína; tiempo 1 h: $3,6 \pm 0,17$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína; tiempo 3 h: $3,46 \pm 0,36$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína; tiempo 6 h: $6,72 \pm 0,19$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína.

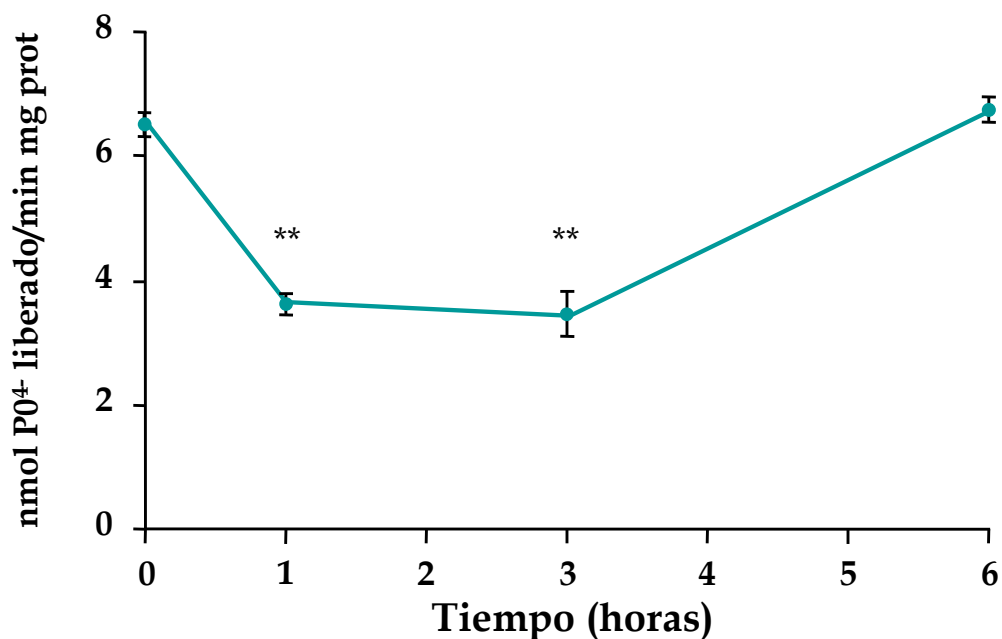


Figura 51.- Actividad tirosín fosfatasa durante la pancreatitis aguda necrótica. Se realizó un estudio de la actividad tirosín fosfatasa en páncreas de ratas con PA necrótica inducida por taurocolato a diferentes tiempos post-inducción. La actividad se determinó a tiempos 0, 1, 3 y 6 h post-inducción de la pancreatitis. La actividad se expresa en nmol fosfato liberados/min mg proteína. Se utilizaron un total de 5 ratas por condición. Las diferencias estadísticas se expresan como: * $p < 0,05$ vs. 0 horas

RESULTADOS

4.3. Actividades de las serín/treonín fosfatasas PP2A, PP2B (Calcineurina) y PP2C durante la pancreatitis aguda necrótica experimental.

Las ser/thr fosfatasas, PPPs, también han sido relacionadas con la regulación de la fosforilación de ERK 1/2 (Zhou y cols., 2002; Ikea y cols., 2006). Por lo tanto, se midió la actividad de las tres principales PPPs, PP2A, PP2B y PP2C durante el transcurso de la PA necrótica experimental.

Las determinaciones se llevaron a cabo en un grupo de ratas control y en otro grupo de ratas sacrificadas 1 h después de la inducción de la PA necrótica.

Durante la PA necrótica experimental se produjo una disminución significativa de la actividad PP2A. Esa actividad en el grupo control fue de $6,01 \pm 1,41$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína, y se redujo hasta $3,07 \pm 0,89$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína en el grupo con PA necrótica (figura 52).

La actividad PP2B (Calcineurina) también apareció reducida en la PA necrótica, disminuyendo significativamente desde $6,87 \pm 1,2$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína en el grupo control, hasta $2,65 \pm 1,22$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína en el grupo control (figura 53).

Asimismo, la actividad PP2C se redujo significativamente en ratas con PA necrótica respecto a las ratas control. Disminuyó desde $7,4 \pm 0,83$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína en el grupo control, hasta $4,9 \pm 1,03$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína en el grupo control (figura 54).

RESULTADOS

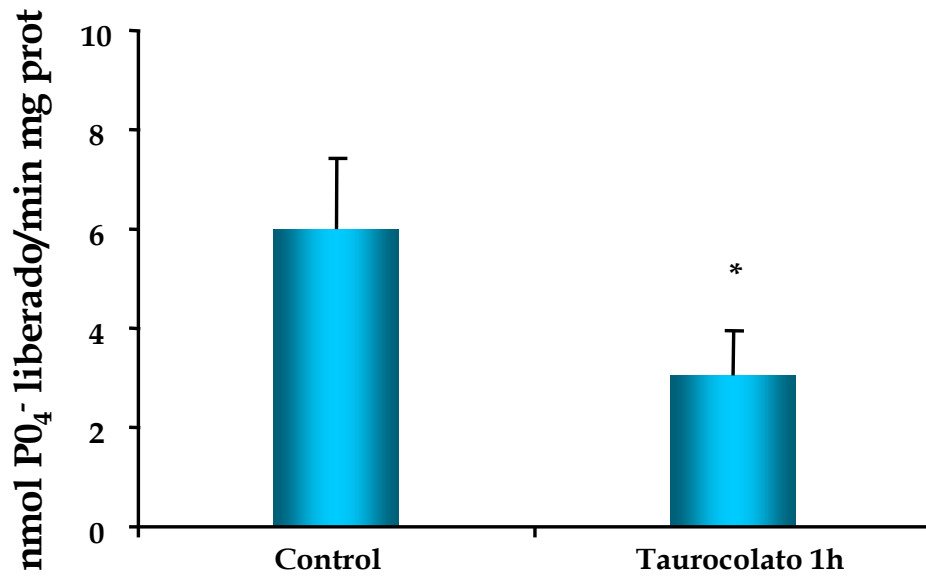


Figura 52.- Actividad de la serín/treonín fosfatasa PP2A en la pancreatitis aguda necrótica. La actividad PP2A se determinó en páncreas de ratas control y de ratas con PA necrótica a 1 h post-inducción, utilizándose un total de 5 ratas por condición. La estadística se expresa como: * $p < 0,05$ vs. 0 horas.

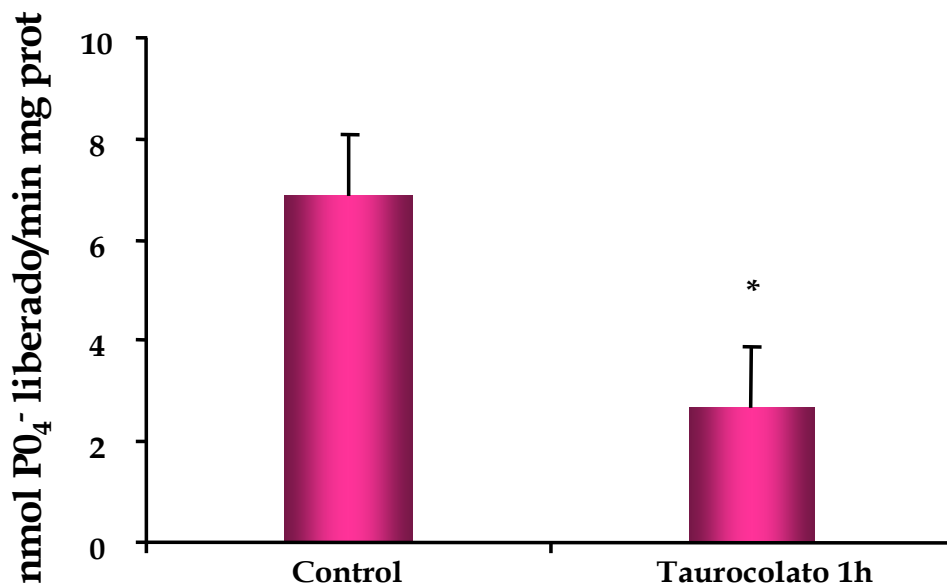


Figura 53.- Actividad de la serín/treonín fosfatasa PP2B en la pancreatitis aguda necrótica. La actividad PP2B se determinó en páncreas de ratas control y de ratas con PA necrótica a 1 h post-inducción, utilizándose un total de 5 ratas por grupo. La estadística se expresa como: * $p < 0,05$ vs. 0 h.

RESULTADOS

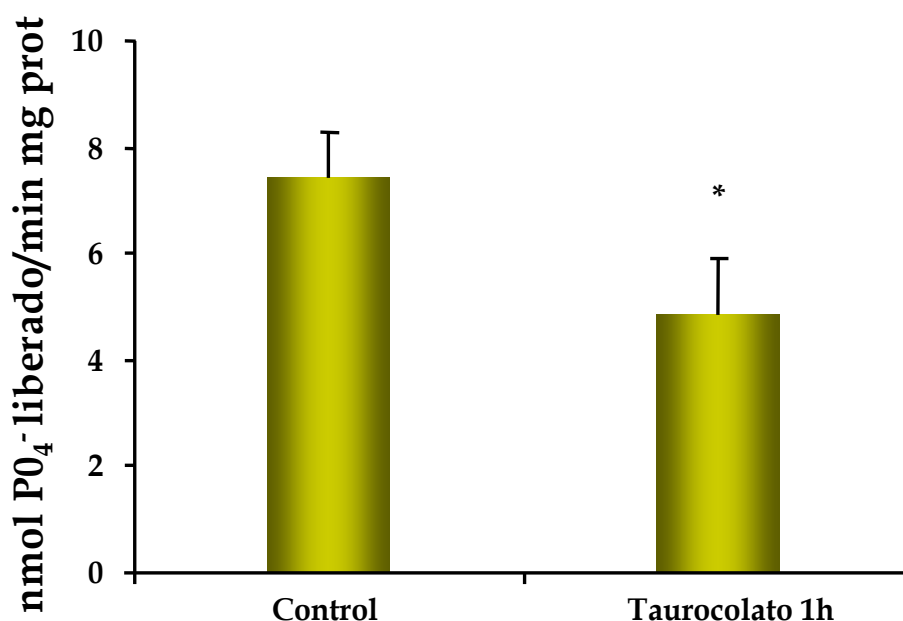


Figura 54.- Actividad de la serín/treonín fosfatasa PP2C en la pancreatitis aguda necrótica. La actividad PP2C se determinó en páncreas de ratas control y de ratas con PA necrótica a 1 hora post-inducción, utilizándose un total de 5 ratas por grupo. La estadística se expresa como: * $p < 0,05$ vs. 0 h.

4.4. Efecto de la pentoxifilina sobre la actividad de las serín/treonín fosfatasas en la pancreatitis aguda necrótica.

Debido a que la pentoxifilina no produjo ningún efecto sobre MEK 1/2 (véase apartado 4.1. de resultados), se decidió investigar si la disminución en la fosforilación de ERK 1/2 causada por la pentoxifilina estaba mediada, al menos en parte, por las serín/treonín fosfatasas. Para ello, se trataron animales con pentoxifilina inmediatamente después de haberles inducido la pancreatitis necrótica, y se sacrificaron 1 h después de la inducción de la pancreatitis. Las determinaciones de las actividades de las tres PPPs en el grupo tratado con pentoxifilina se realizaron simultáneamente a las determinaciones del apartado 4.3. (figuras 52, 53, y

RESULTADOS

54), siendo una condición más de los experimentos. La figura 55 muestra las actividades de la PP2A, PP2B y PP2C para los tres grupos, ratas control, ratas con pancreatitis y ratas con pancreatitis tratadas con pentoxifilina, estos últimos dos grupos 1 h post-inducción.

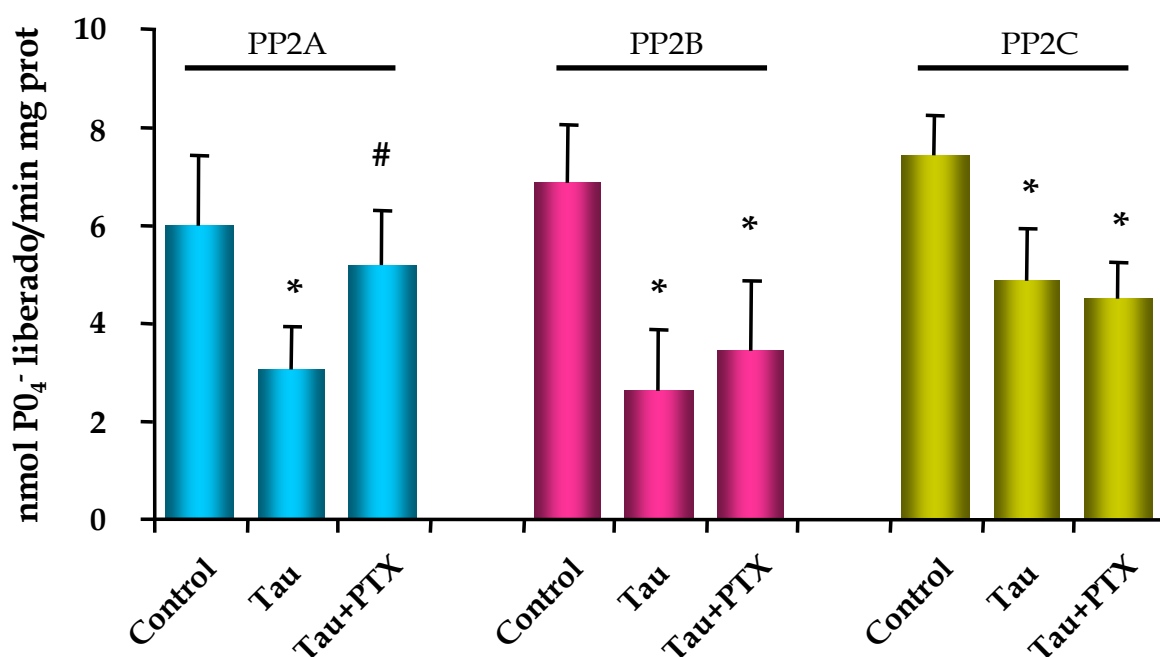


Figura 55.- Efectos de la pentoxifilina sobre las actividades, PP2A, PP2B (calcineurina) y PP2C en la pancreatitis aguda necrótica. Las actividades de PP2A, PP2C y PP2C fueron determinadas en páncreas de ratas control, de ratas con PA necrótica 1 h post-inducción y de ratas con pancreatitis aguda tratadas con pentoxifilina. Se utilizaron un total de 5 ratas por grupo para la actividad PP2A y de 3 ratas por grupo para la PP2B y PP2C. La estadística se expresa como: * $p < 0,05$ vs. control y # $p < 0,05$ vs. taurocolato.

El tratamiento con pentoxifilina previno de manera significativa la disminución provocada por la pancreatitis aguda sobre la actividad PP2A en páncreas, mientras que no tuvo ningún efecto significativo sobre la disminución de las actividades PP2B y PP2C (figura 55). Los valores

RESULTADOS

obtenidos fueron para PP2A (Grupo) Control: $6,01 \pm 1,41$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína; Taurocolato: $3,07 \pm 0,89$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína; Taurocolato + pentoxifilina: $5,16 \pm 1,17$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína); para PP2B (Grupo) Control: $6,87 \pm 1,2$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína; Taurocolato: $2,65 \pm 1,22$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína; Taurocolato + pentoxifilina: $3,42 \pm 1,43$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína; y para PP2C (Grupo) Control: $7,4 \pm 0,83$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína; Taurocolato: $4,9 \pm 1,03$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína; Taurocolato + pentoxifilina: $4,49 \pm 0,77$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína.

4.5. Actividad PP2A *in vitro* en células AR42J. Efectos del taurocolato, de la pentoxifilina y del dibutiril cíclico AMP.

Para profundizar en el mecanismo de acción de la pentoxifilina sobre la actividad PP2A durante la PA necrótica, se cambió el modelo de estudio pasando de la experimentación *in vivo* a experimentación *in vitro* con la línea celular AR42J de cáncer de páncreas de rata.

Lo primero que se estudió en este modelo celular fue la viabilidad que las células AR42J exhibían incubadas con taurocolato sódico. Para realizar los pertinentes estudios, se realizaron ensayos para encontrar la concentración de taurocolato sódico suficiente para producir un estímulo de señalización sin llegar a producir unos niveles de mortalidad significativos.

Se realizó dicho estudio utilizando un gradiente de concentración que comprendía desde 0 a 1% de taurocolato en el medio de cultivo, y la mortalidad se determinó por el método del MTT.

La concentración de taurocolato sódico escogida para los ensayos *in vitro* fue taurocolato del 0,3%, la cual produce una mortalidad del $17 \pm 5\%$, sin observarse significación en el test estadístico (figura 56).

RESULTADOS

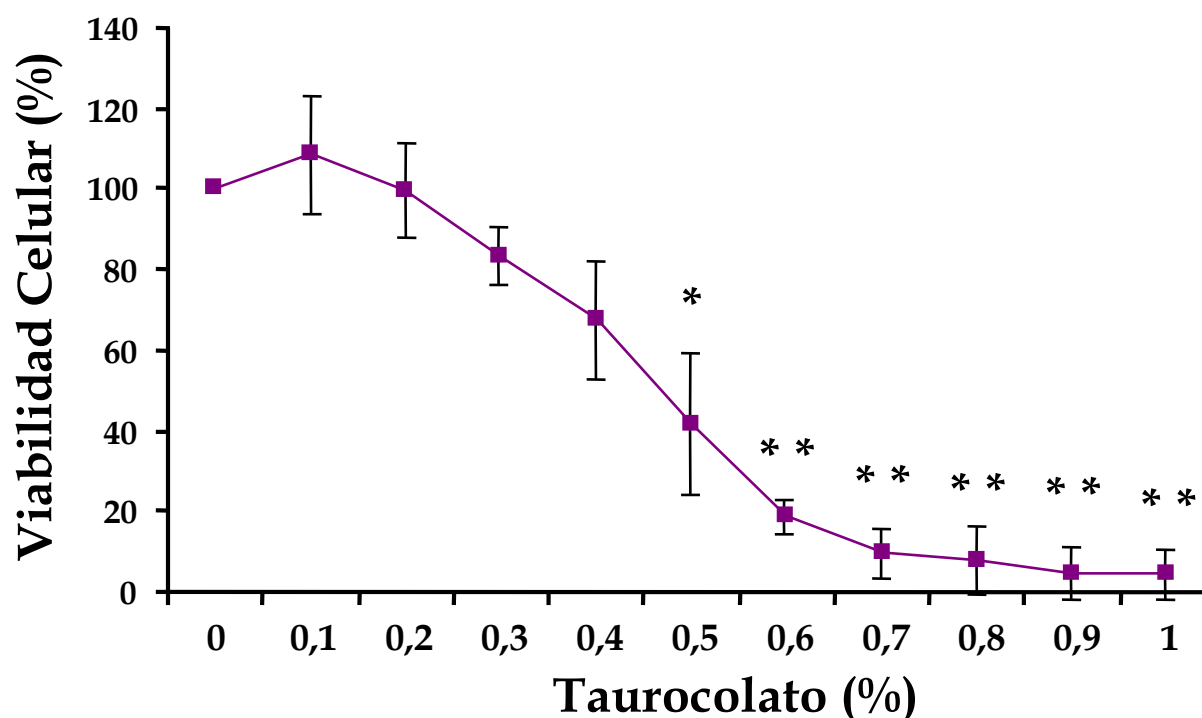


Figura 56.- Curva dosis respuesta de taurocolato sódico en células AR42J. Se realizaron un total de 5 réplicas por condición y se determinó la viabilidad celular por MTT. La estadística se expresa como: * $p < 0,05$ vs. 0% y ** $p < 0,01$ vs. taurocolato.

Posteriormente, se realizaron estudios cinéticos sobre la actividad PP2A para intentar caracterizar la disminución en la actividad de PP2A en las células AR42J incubadas con taurocolato al 0,3%. Para ello, después de la incubación con el taurocolato se recogieron las células a los tiempos 0, 5, 15 y 30 min.

La figura 57 representa la cinética de la actividad PP2A en células AR42J incubadas con taurocolato sódico, en la que se puede observar que la disminución más notable y significativa de la actividad se produjo rápidamente, a los 5 min de la incubación, reduciéndose su actividad desde $8,8 \pm 1$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína hasta $6,3 \pm 1$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína. Después de esta disminución a los 5

RESULTADOS

min, la actividad PP2A se recuperó con el tiempo siendo su valor de $9,3 \pm 2,5$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína a los 15 minutos y de $8,4 \pm 1,7$ nmol PO_4^- liberado/min x mg proteína a los 30 min de la inducción.

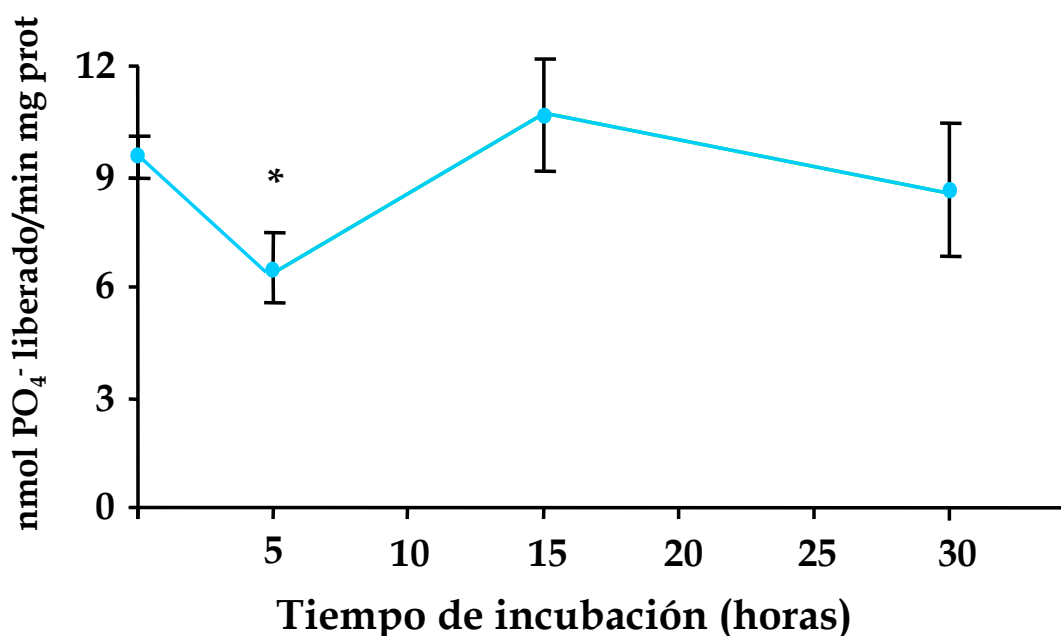


Figura 57. Evolución de la actividad PP2A en células AR42J incubadas con taurocolato sódico al 0,3%. Se realizaron un total de 5 réplicas por condición. La estadística se expresa como: * $p < 0,05$ vs. tiempo 0 y ## $p < 0,01$ vs. 5 min.

Para intentar explicar el mecanismo de acción de la pentoxifilina en la prevención que produce sobre la pérdida de la actividad PP2A, se pensó en la posibilidad de que estuviera implicado el mensajero secundario AMP cíclico (AMPc), ya que la pentoxifilina es inhibidor de fosfodiesterasas.

La comprobación de esta posibilidad se llevó a cabo incubando células AR42J con taurocolato sódico al 0,3% en presencia de pentoxifilina (12mg/L) o dibutilil AMPc (dbAMPc) (0,5 mM), precursor estable del AMPc.

RESULTADOS

Las muestras fueron recogidas 5 min después de haber sido incubadas con taurocolato.

El taurocolato sódico volvió a producir una disminución significativa de la actividad PP2A, y tanto la pentoxifilina como el dbAMPc previnieron de forma total la disminución la actividad PP2A, revirtiéndola a los niveles del grupo control (figura 58). La actividad PP2A en los respectivos grupos fue (grupo) control $9,6 \pm 0,7$ nmol PO_4^- liberado/min x mg prot.; taurocolato $6,7 \pm 1,2$ nmol PO_4^- liberado/min x mg prot.; taurocolato + pentoxifilina $10,4 \pm 0,7$ nmol PO_4^- liberado/min x mg prot.; taurocolato + dbAMPc $10,9 \pm 0,5$ nmol PO_4^- liberado/min x mg prot.

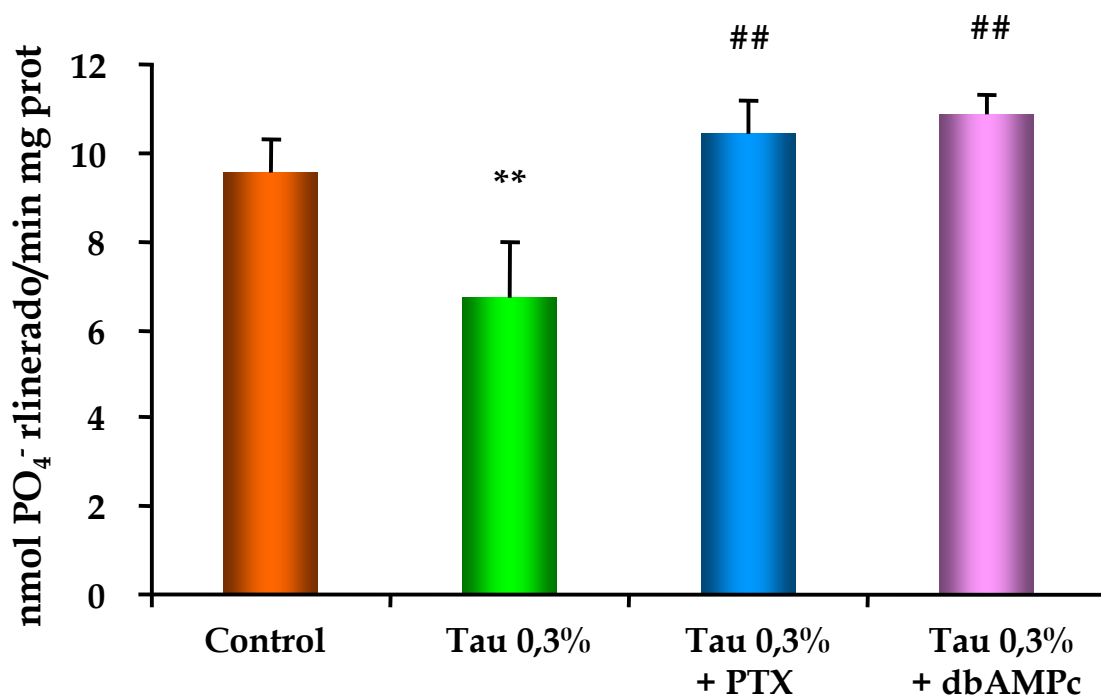


Figura 58. Efecto de la pentoxifilina (PTX) y del dibutiril AMP cíclico (dbAMPc) sobre la actividad PP2A en células AR42J incubadas con taurocolato sódico al 0,3%. Se realizaron un total de 6 réplicas para las determinaciones. La estadística se expresa como: ** $p < 0,01$ vs. control y ## $p < 0,01$ vs. taurocolato.

RESULTADOS

Se estudió también el efecto del taurocolato y de la pentoxifilina sobre los niveles de AMPc intracelular, utilizando como control positivo el dbAMPc.

La concentración de AMPc disminuyó significativamente en la PA necrótica y aumentó en presencia de la pentoxifilina (figura 59). Los valores obtenidos fueron (Grupo) control: 167 ± 11 pmol/mg proteína; taurocolato: 129 ± 5 pmol/mg proteína; taurocolato + pentoxifilina: 163 ± 20 pmol/mg proteína); Control positivo (taurocolato + dibutiril AMPc): 280 ± 98 pmol/mg proteína.

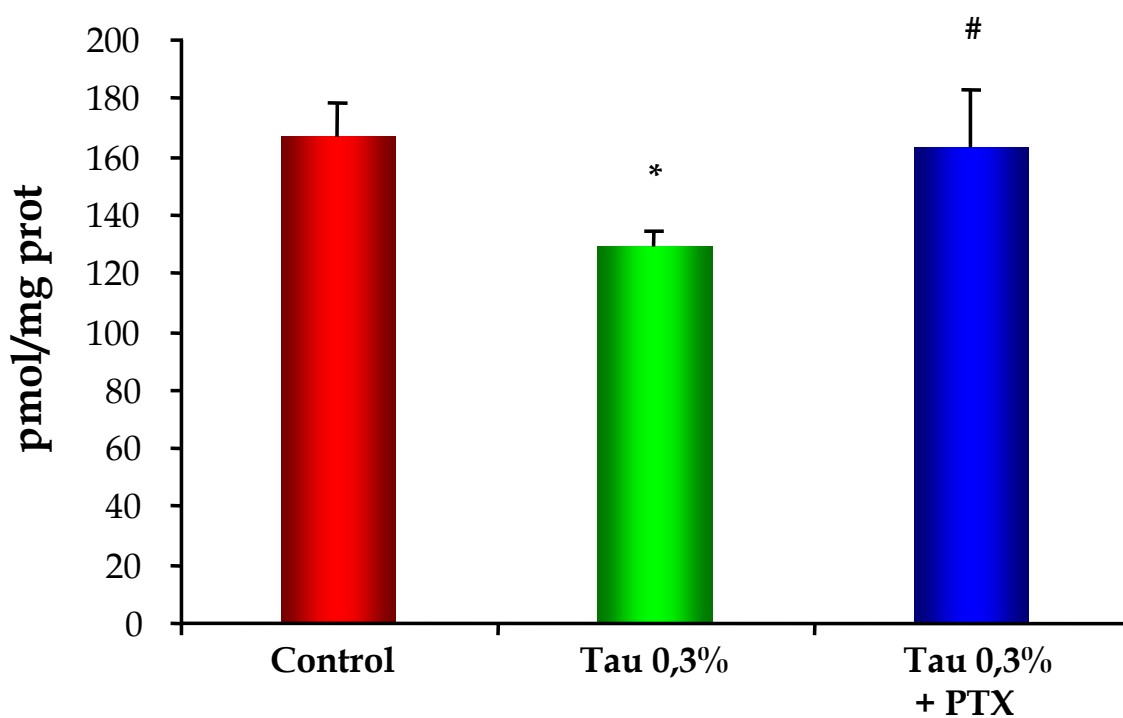


Figura 59.- Efecto de la pentoxifilina (PTX) sobre la concentración de AMPc en células AR42J incubadas con taurocolato sódico al 0,3%. Se realizaron un total de 6 réplicas para las determinaciones. La estadística se expresa como: ** $p < 0,01$ vs. control, ## $p < 0,01$ vs. taurocolato.

RESULTADOS

Por conocer cómo se regula su expresión en el desarrollo de la PA necrótica, se realizó un estudio por inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Estos ensayos permiten determinar si existe unión del complejo histona desacetilasa mSIN3A-HDAC1 y de las histona acetiltransferasas CBP y PCAF al promotor de *egr-1* en páncreas de ratas control, ratas con PA necrótica y ratas con PA necrótica tratadas con pentoxifilina. El resultado del análisis fue que en la pancreatitis aguda necrótica, 3 h después de la inducción de la misma, aumentaba claramente la unión del complejo histona deacetilasa y de la histona acetiltransferasa CBP al promotor de *egr-1* respecto a los niveles de los controles. En el grupo de animales tratados con pentoxifilina, los niveles de unión del complejo mSIN3A-HDAC1 y de CBP al promotor de *egr-1* fueron similares a los niveles basales, por tanto, la pentoxifilina bloqueaba la unión del complejo histona deacetilasa y de la acetiltransferasa CBP al promotor de *egr-1* (figura 61).

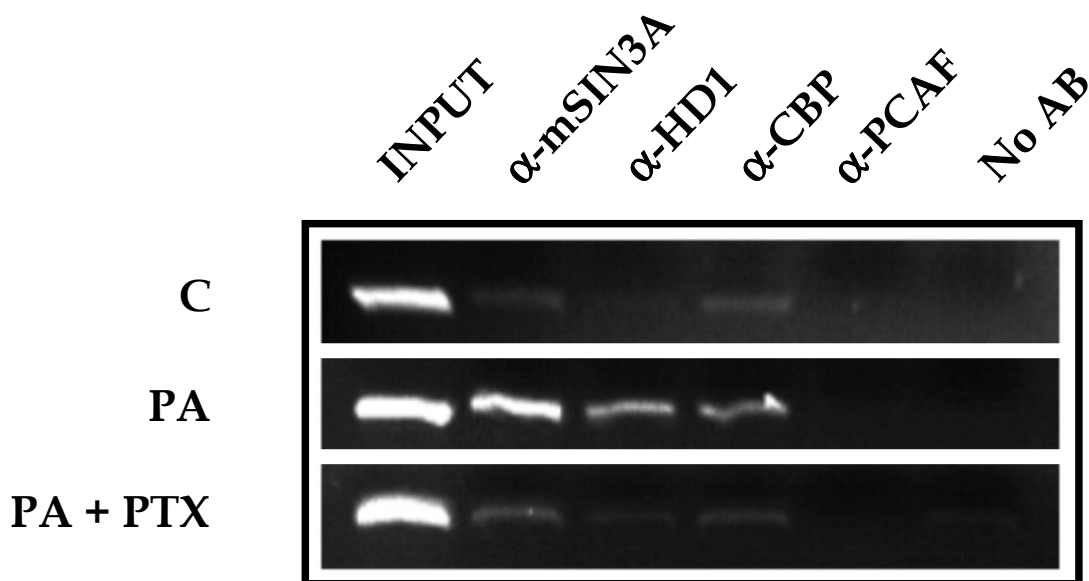


Figura 61.- Prevención de la pentoxifilina (PTX) sobre el reclutamiento de histona deacetilasas e histona acetiltransferasas en el promotor de *egr-1* en la pancreatitis aguda. Imagen representativa de 3 experimentos distintos, del revelado de la PCR semicuantitativa correspondiente al análisis por ChIP en páncreas de ratas control (C), de ratas con PA necrótica (PA) y de ratas con PA necrótica tratadas con pentoxifilina (PA + PTX), sacrificadas a las 3 h post-inducción. Se utilizaron anticuerpos contra las subunidades de las subunidades del complejo deacetilasa mSIN3A y HDAC1 y de las acetiltransferasas CBP y PCAF.

RESULTADOS

Otros genes pro-inflamatorios de gran relevancia en el transcurso de la pancreatitis aguda son los genes de respuesta tardía como la óxido nítrico sintasa inducible (*inos-2*) y el factor de adhesión molecular 1 (*icam-1*), por lo que también se realizaron ChIPs para analizar la unión del complejo histona deacetilasa mSIN3A y HDAC1 y de las histona acetiltransferasas CBP, PCAF a los promotores de ambos genes, en las mismas muestras utilizadas para el ChIP contra *egr-1*.

En el caso de páncreas de ratas con PA necrótica, se produjo un reclutamiento de las acetiltransferasas CBP y PCAF en el promotor de *icam-1*, y por el contrario en las ratas tratadas con la pentoxifilina no se produjo tal unión; además, la pentoxifilina promovió el reclutamiento del complejo histona deacetilasa mSIN3A-HDAC1 (figura 62).

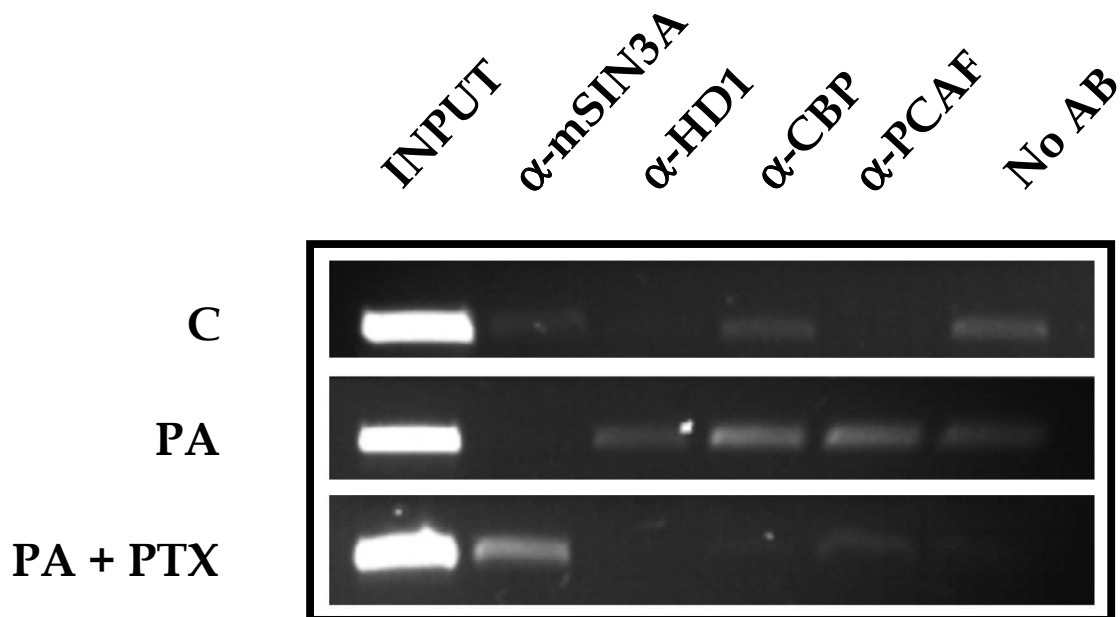


Figura 62.- Prevención de la pentoxifilina (PTX) sobre el reclutamiento de histona deacetilasas e histona acetiltransferasas en el promotor de *icam-1* en la pancreatitis aguda. Imagen representativa de 3 experimentos distintos del revelado de la PCR semicuantitativa correspondiente al análisis por ChIP en páncreas de ratas control (C), de ratas con PA necrótica (PA) y de ratas con PA necrótica tratadas con pentoxifilina (PA + PTX), sacrificadas a las 3 h post-inducción. Se utilizaron anticuerpos contra las subunidades del complejo deacetilasa mSIN3A y HDAC1 y de las acetiltransferasas CBP y PCAF.

RESULTADOS

En el caso de *inos-2*, se observó la unión de CBP al promotor en la PA, la cual aumenta ligeramente en presencia de la pentoxifilina, pero la pentoxifilina también promueve la unión del complejo histona deacetilasa mSIN3A-HDAC1 al promotor de *inos-2* (figura 63).

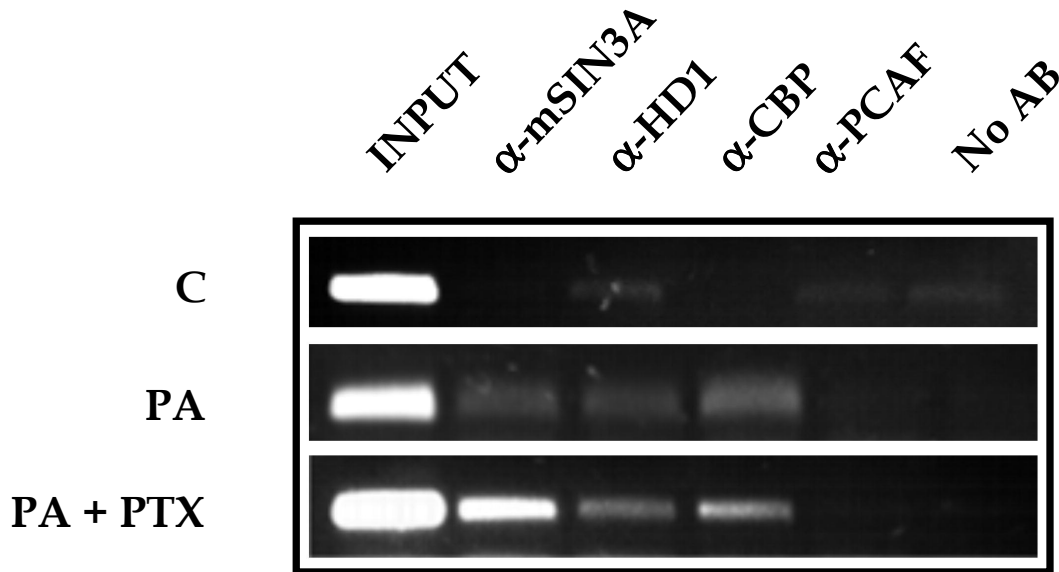


Figura 63.- Prevención de la pentoxifilina (PTX) sobre el reclutamiento de histona deacetilasas y acetiltransferasas en el promotor de *inos2* en la pancreatitis aguda (PA). Imagen representativa de 3 experimentos distintos del revelado de la PCR semicuantitativa correspondiente al análisis por ChIP en páncreas de ratas control (C), de ratas con PA necrótica (PA) y de ratas con PA necrótica tratadas con pentoxifilina (PA + PTX), sacrificadas a las 3 h post-inducción. Se utilizaron anticuerpos contra las subunidades del complejo deacetilasa mSIN3A y HDAC1 y de las acetiltransferasas CBP y PCAF.

También se analizó la unión de los complejos modificadores de la cromatina que la PA necrótica y la presencia de la pentoxifilina producen sobre el promotor de *tnf- α* utilizando las mismas muestras que para los anteriores genes. En ratas con PA necrótica, aparecieron unidas tanto las histona acetiltransferasas CBP y PCAF como el complejo histona deacetilasa mSIN3A-HDAC1 al promotor de *tnf- α* , aunque PCAF lo hace de

RESULTADOS

manera menos intensa. La pentoxifilina no produjo casi efecto sobre la unión del complejo de acetilasa, mientras que bloqueó la unión de las acetiltransferasas al promotor del *tnf- α* (figura 64).

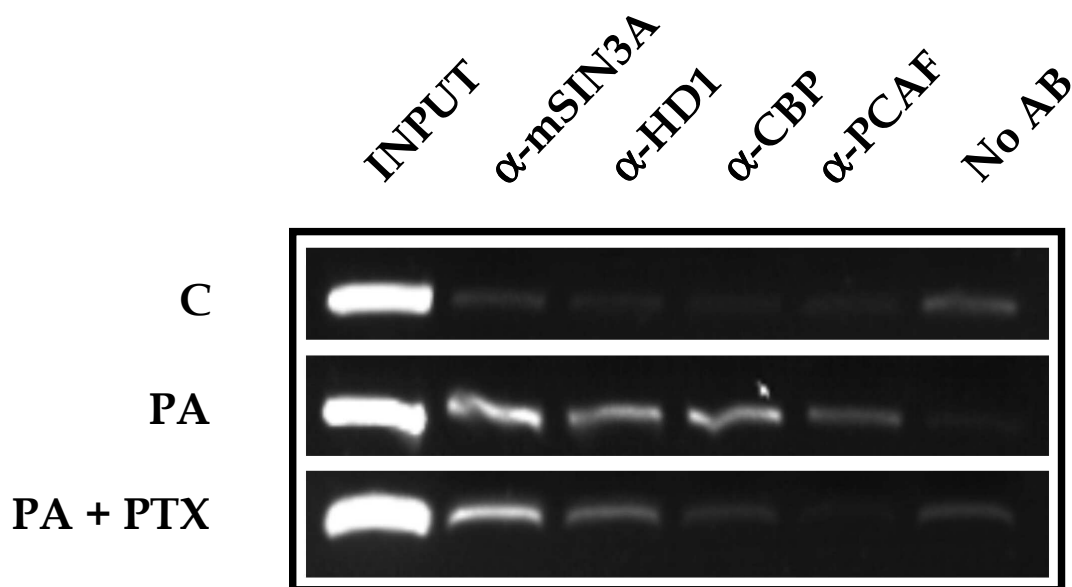


Figura 64.- Prevención de la pentoxifilina (PTX) sobre el reclutamiento de histona deacetilasas y acetiltransferasas en el promotor de *tnf- α* en la pancreatitis aguda. Imagen representativa de 3 experimentos distintos del revelado de la PCR semicuantitativa correspondiente al análisis por ChIP en páncreas de ratas control (C), de ratas con PA necrótica (PA) y de ratas con PA necrótica tratadas con pentoxifilina (PA + PTX), sacrificadas a las 3 h post-inducción. Se utilizaron anticuerpos contra las subunidades del complejo de acetilasa mSIN3A y HDAC1 y de las acetiltransferasas CBP y PCAF.

IV-DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La pancreatitis aguda (PA) es una enfermedad relativamente frecuente en nuestros días. Se genera principalmente por dos causas muy comunes en la sociedad actual, el consumo abusivo de alcohol y los cálculos biliares. La PA junto a la pancreatitis crónica forman las patologías de tipo inflamatorio que se originan en el páncreas. Su evolución varía ampliamente, en la mayoría de los casos es leve y de curso autolimitado, y que con medidas terapéuticas apropiadas se recupera la normalidad en pocos días. Aproximadamente un 20% de los casos de la enfermedad evolucionan desarrollando complicaciones sistémicas o locales lo que da lugar a un cuadro clínico de gravedad variable, que condiciona una mortalidad entre el 10-45% (Sekimoto y cols., 2006).

Desde la década de los 70 se ha tratado de unificar criterios para pronosticar y diagnosticar la severidad y tratar a los pacientes con pancreatitis (Ranson y cols., 1974; Larvin y McMahon, 1989), pero las principales preguntas que se plantean tanto médicos como investigadores siguen sin respuesta. Así nos planteamos cuestiones de ¿Cómo se podría diagnosticar mas precozmente la PA?; en el momento que ingresa un paciente afecto de PA, ¿qué tratamiento se le podría administrar para atenuar el proceso inflamatorio?. Además, para tratar con éxito al enfermo de PA, ¿cuál es el margen de tiempo del que se dispone entre que se toman los datos al paciente, se le atiende y se le diagnóstica la PA?.

Para intentar responder estas preguntas, es necesario insmiscuirse en los mecanismos moleculares que acontecen durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria pancreática.

Afortunadamente, en la actualidad disponemos de diferentes modelos para producir y estudiar la pancreatitis aguda en animales, todos ellos caracterizados y establecidos tanto para inducir pancreatitis aguda leve como grave. Para el desarrollo de esta tesis, han sido utilizados dos de esos modelos que presentan una alta reproducibilidad, como son el modelo de pancreatitis aguda edematosa leve inducida por ceruleína, y el modelo de pancreatitis aguda necrótica grave inducida por infusión retrógrada de taurocolato sódico en ratas, ambos modelos manejados por nuestro grupo de investigación durante varios años. Los modelos *in vivo* permiten

DISCUSIÓN

estudiar el comportamiento celular en el animal y mostrar qué es lo que podría pasar en humanos. Sin embargo, el inconveniente de los modelos *in vivo* es el sacrificio de muchos animales para obtener resultados. En nuestro grupo también manejamos de manera regular desde hace tiempo un modelo *in vitro* de una línea celular de cáncer de páncreas denominada AR42-J. Los modelos *in vitro* sirven para complementar y profundizar las investigaciones sin tener que sacrificar animales, pero las observaciones que se obtienen de la experimentación *in vitro* muchas veces no se corresponden completamente con lo que ocurre *in vivo*. Por eso, para el estudio de la PA se hace necesario el uso tanto de modelos *in vitro* como de modelos *in vivo*.

Debido a numerosas investigaciones, se sabe que durante la PA, al igual que en otras patologías, se genera estrés oxidativo (Sanfey y cols., 1984 y 1986; Tsai y cols., 1998; Schulz y cols., 1999,; Pereda y cols., 2006) y se activan vías de señalización celular como la de las MAPK (Duan y cols., 1995; Grady y cols., 1996; Dabrowski y cols., 1996; Schafer y cols., 1998; Wagner y cols., 1999; Simeone y cols., 2001; Williams y cols., 2002; Sans y cols., 2004, Pereda y cols., 2004). Esta demostrado que durante la pancreatitis se produce una disminución de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx (Leung y Chan, 2009), y un aumento de enzimas pro-oxidantes como la xantina oxidasa, que generan ROS/RNS. Además, la activación de las MAPK propicia el aumento de la cascada inflamatoria disminuyendo proteínas anti-inflamatorias, como IL-10 o IL-4, favoreciendo la síntesis de proteínas pro-inflamatorias, como TNF- α , IL-1 β , o IL-6. Estas actúan activando y atrayendo cada vez a más células mediadoras de la inflamación, como neutrófilos, macrófagos, *natural killer* y otros linfocitos y promoviendo una respuesta inflamatoria exagerada e incontrolada en el páncreas. En la mayoría de los casos, la propagación y amplificación de la inflamación se consigue frenar y tiende a disminuir mediante un mecanismo de apoptosis, disminuyendo el número de células activadas, produciéndose progresivamente el cese de la cascada inflamatoria y recuperándose la normalidad tisular en el páncreas (Fendrich y cols., 2008).

DISCUSIÓN

Durante la PA, el daño causado por los ROS/RNS es más acusado en las células acinares debido a que se acompaña de un descenso de las defensas celulares antioxidantes, tanto la enzimática como no enzimática, en la que cabe destacar un pronunciado descenso de los niveles de GSH (Leung y Chan, 2009).

Ese descenso de los niveles de GSH es crítico en la progresión de la severidad de la PA y podría ser un acontecimiento clave en el desarrollo de los cuadros más graves de la enfermedad.

1. INDUCCIÓN INEFICAZ DE LA GLUTAMIL CISTEÍNA LIGASA EN LA PANCREATITIS AGUDA NECRÓTICA.

1.1. Disminución de los niveles de glutatión reducido durante la pancreatitis aguda.

Uno de los objetivos de esta tesis ha sido intentar caracterizar la degradación de GSH en la pancreatitis aguda. Ya era bien conocido que durante la pancreatitis aguda se produce la disminución de los niveles intracelulares de glutatión reducido (Gomez-cambronero y cols., 2000), y en la presente tesis se ha observado que esa disminución se produce rápidamente (a la media hora de la inducción ya se ve un descenso significativo de los niveles) tanto en la pancreatitis aguda leve o edematosa como en su forma más severa o necrótica. Además se ha seguido la evolución de los niveles de GSH en el tiempo descubriendo que mientras que en la PA necrótica experimental los niveles de GSH se mantienen deplecionados al menos durante las 6 primeras horas de la patología, en el caso de la PA edematosa a las 6 h ya se empieza a ver una recuperación significativa de los niveles de GSH. La disminución de los niveles de GSH en la PA no se correlaciona con un aumento de los niveles del

DISCUSIÓN

glutación oxidado o GSSG (Gomez-cambroneró y cols., 2000), por lo que parece descartada la oxidación como la principal causa de disminución del GSH.

La recuperación de los niveles de GSH durante la PA edematosa y la ausencia de la misma en la PA necrótica, sugiere que el GSH puede tener un papel relevante en la evolución de la enfermedad hacia la forma leve o grave.

1.2. Papel de la glutamato cisteína ligasa en la depleción de glutatión en la pancreatitis aguda.

En resultados previos a esta tesis doctoral, encontramos que los niveles de ARN mensajero de la glutamato cisteína ligasa (GCL), enzima limitante en la síntesis de GSH también conocida como γ -glutamil cisteína sintetasa (GCS), aparecían aumentados en la PA edematosa de manera temprana, mientras que en la PA necrótica la síntesis del ARN mensajero sólo aumentaba de manera tenue a las 6h de la inducción de la pancreatitis.

En la presente tesis doctoral, se ha comprobado que los niveles proteicos de la GCL aumentan rápida y significativamente en la PA edematosa y que no lo hacen en la necrótica, indicando que durante la PA, después de la caída del nivel de GSH, en las formas leves de la patología se produce una respuesta celular que activaría la transcripción de la GCL.

Sorprendentemente, y en contra de lo que se esperaba, la ARN polimerasa II (RNAPol II) aparecía unida a los promotores y a los exones de los genes de la subunidad catalítica y de la reguladora de la enzima tanto en la PA edematosa como en la PA necrótica, lo que sugiere que la transcripción de la GCL se encuentra activa en ambos tipos de pancreatitis (resultados no mostrados en el presente trabajo).

Fruto del trabajo investigador de esta tesis hemos podido constatar, mediante análisis por inmunoprecipitación de fragmentos de

DISCUSIÓN

cromatina (ChIP), que el factor de transcripción c-MYC aparece unido a los promotores de las subunidades catalítica y reguladora de la GCL en ambos tipos de pancreatitis. Este factor de transcripción se ha descrito como regulador de la expresión de la GCL a través de la vía de la MAP quinasa ERK 1/2 (Benassi y cols., 2006), por lo que ese nuevo hallazgo a nivel transcripcional nos ha llevado a analizar la expresión de las proteínas implicadas en esa regulación, es decir ERK y c-MYC. Para que ERK 1/2 y c-MYC estén presentes de manera activa y funcional es necesario que éstas se encuentren en su forma fosforilada. Al cuantificar los niveles de la fosforilación de ERK 1/2 y c-MYC hemos observado un aumento de la fosforilación de ambos factores tanto en la PA edematosa como en la necrótica, confirmando que esta respuesta celular a la depleción de los niveles de GSH se produce en todas las formas de PA experimental. Entonces se nos planteó la cuestión de ¿Por qué fallaba el mecanismo durante la PA grave?

1.3. Actividad citosólica de la ribonucleasa pancreática en la pancreatitis aguda.

La respuesta a la pregunta planteada en el apartado anterior se resolvió al determinar la actividad de la ribonucleasa pancreática en extractos citosólicos de páncreas de rata, la cuál era mucho más elevada en los extractos citosólicos de ratas con PA necrótica que en los de ratas con PA edematosa, en esta última similar a la actividad ribonucleasa de los extractos citosólicos de ratas control.

Por tanto cabía la posibilidad de que se produjera la degradación del ARN por un aumento de la actividad ribonucleasa pancreática en el citosol de células acinares durante la pancreatitis aguda necrótica, afectando entre otros al ARNm de la GCL.

La presencia de la ribonucleasa pancreática en el citosol de células acinares de ratas con PA necrótica se confirmó después de realizar una cromatografía de afinidad de extractos citosólicos de páncreas de ratas con

DISCUSIÓN

PA necrótica en la que se retuvieron proteínas conjugadas con un inhibidor de serín peptidasas, el 2,4-aminoetilbencenilfluoruro (AEBSF) y de la posterior identificación de la huella peptídica de las proteínas presentes en los eluatos mediante la técnica de espectrofotometría de masas MALDI-TOF.

1.3.1. Mecanismos implicados en la activación de la ribonucleasa pancreática en la PA necrótica.

La ribonucleasa pancreática es una enzima sintetizada por el páncreas exocrino y secretada con el jugo pancreático que en rumiantes tiene una función esencial degradando una gran cantidad de ARNs de origen microbiano acumulados por estos animales. Se considera que el resto de ribonucleasas pancreáticas de mamíferos son un vestigio de la ribonucleasa de rumiantes, ya que no necesitan asimilar el fósforo y el nitrógeno producidos por ellas (Barnard, 1969). También aparece en otros tejidos como el riñón, cerebro, en el plasma seminal y orina (Sorrentino y cols., 1998).

Intracelularmente se puede localizar en el citosol, o en compartimentos vacuolares de la ruta secretora y endocítica zimógeno (Haigis y Raines, 2003), y su degradación se produce en los lisosomas (McElligott y cols., 1985). En el citosol normalmente aparece inhibida por una proteína muy abundante llamada inhibidor de la ribonucleasa, cIR, que constituye el 0,1% de las proteínas celulares (Shapiro, 2001).

El cIR, tiene un elevado contenido de cisteínas y leucinas, es sensible a la oxidación (Kobe y Deisenhofer, 1991) y parece presentar un papel muy importante en la homeostasis redox intracelular. Se ha descrito que la eliminación del cIR aumenta el daño oxidativo al ADN y favorece la disminución de los niveles de GSH intracelular (Monti y cols., 2007).

Esta descrito que la Glutarredoxina (GRx), enzima relacionada con el GSH y que hemos encontrado en citosol de páncreas en la PA (véase apartado 2.2.1. de la discusión), participa en la activación/inactivación de la ribonucleasa pancreática (Lundström-Lung y Holmgren, 1995). La

DISCUSIÓN

ribonucleasa pancreática consta de 8 grupos tiólicos y puede presentar distintos intermediarios oxidados formando puentes disulfuro entre tioles o con el del GSH que proporcionan múltiples variantes de la enzima con diferente grado de activación. La forma más reducida (ribonucleasa-(SH)₈) es la forma más inactiva y la más oxidada (ribonucleasa-(SH)₄) la más activa es la forma más oxidada, ribonucleasa-(S₂)₄, y su equilibrio redox depende del cociente GSH/GSSG y del sistema NADPH/GSH reductasa/GSH (Lundström-Lung y Holmgren, 1995). La inactivación de la enzima por tanto es dependiente del GSH y además se produce tanto en condiciones alcalinas (Kim y Paik, 1968) como ácidas, siendo más efectiva en medio ácido (Scheraga y cols., 1987).

Este mecanismo cobra una vital importancia al observar el diferente potencial redox que presentan las diferentes estructuras celulares (citosol, mitocondria, núcleo, la ruta de secreción o el espacio extracelular). Por ejemplo, mientras que en el citosol o en el núcleo prevalece un ambiente reductor, el transporte de GSSG preserva un ambiente oxidativo en los orgánulos involucrados en la secreción manteniendo las enzimas activas y listas para su exportación (Go y Jones, 2008). Valores del cociente GSH/GSSG por debajo de 10 favorecen la formación de puentes disulfuros, como en el caso del retículo endoplasmático (RE), donde el cociente GSH/GSSG es 1:1 a 3:1, mucho menor que el cociente celular total que es de 30:1 a 100:1 (Go y Jones, 2008).

En definitiva, la regulación de la homeostasis redox en las células acinares es sensible a las variaciones de concentración del GSH. El descenso de los niveles de GSH en el citosol durante la PA, podría originar un ambiente oxidativo que en el caso la PA grave, junto con la oxidación del cIR y el debilitamiento que se produce de las membranas celulares propiciaría la presencia de la ribonucleasa pancreática activa en el citosol de las células acinares. Por tanto, cabe pensar que estamos ante un mecanismo de autorregulación por parte del propio GSH, que conduce a la recuperación de los niveles de GSH en los cuadros leves de la PA edematosa. Podría favorecer, por el contrario, el mantenimiento de los niveles de GSH deplecionados a través de la ribonucleasa pancreática,

DISCUSIÓN

siendo esta última responsable de la degradación del ARNm de la GCL ante un estrés más intenso, favoreciendo la disminución del cociente GSH/GSSG y frenando la maquinaria de síntesis del GSH, provocando los cuadros más graves de la PA necrótica.

2. DEGRADACIÓN DE GSH MEDIANTE HIDRÓLISIS DURANTE LA PANCREATITIS AGUDA.

El éxito celular para restablecer los niveles de GSH deplecionados en los primeros estadios de la PA está implicado en el aumento o cese del proceso inflamatorio. Esa respuesta está mediada, al menos en parte, por una de las tres principales MAPK, la ERK 1/2. Sin embargo, como se ha explicado en el apartado anterior, hay numerosas pruebas que apuntan al GSH como modulador principal del mecanismo de la respuesta celular al estrés originado en la PA. La disminución de los niveles de GSH está asociada con el inicio de la cascada inflamatoria, aunque esa disminución no se produce por formación de GSSG (Gomez-cambrero y cols., 2000). Si todo esto es correcto, ¿Por qué se deplecionan entonces los niveles de GSH al inicio de la PA? o ¿Quién o quienes son los responsables de esa degradación?. Si fuésemos capaces de descubrir qué ocurre nada más iniciarse, esto podría tener una repercusión fisiopatológica muy importante a la hora de acertar en el modo de actuación con enfermos afectados de PA. Esto sería de capital sobre todo a la hora de prevenir el desencadenamiento de la PA grave, aplicando un pre-tratamiento efectivo en pacientes o en situaciones con riesgo, como muchos enfermos con patologías biliares, alcohólicos, en personas tras comidas copiosas o tras realizar una colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE).

Nuestro grupo de investigación, además de observar que durante la PA el GSH disminuía y no se oxidaba, también descubrió que *in vitro* en células pancreáticas AR42J, el taurocolato sódico disminuía el GSH y que

DISCUSIÓN

el cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) utilizado rutinariamente en los tampones de homogenización de tejidos y células, prevenía de manera significativa esa depleción de GSH. No obstante, de todos los componentes del cóctel, el único capaz de prevenir esa depleción de GSH tras los análisis fue el AEBSF.

Uno de los objetivos de esta tesis ha sido intentar caracterizar esa degradación de GSH durante la pancreatitis aguda y ver el efecto del AEBSF *in vivo*, además de intentar dar un poco más de luz a ese mecanismo.

En este sentido, lo primero que se determinó fue la tasa de degradación de GSH en homogenados de páncreas de ratas control y de ratas con PA necrótica. A estos homogenados se les añadió GSH exógeno para hacer más detectable esa actividad, junto con los inhibidores de proteasas presentes en el cóctel a excepción del AEBSF, que se añadía posteriormente para confirmar el efecto. *In vitro*, la concentración de GSH en las células AR42J se medía 1 h después de adicionar el taurocolato sódico. *In vivo*, después de realizar varios experimentos preliminares, se vio que lo mejor para realizar los análisis era preparar los homogenados a partir de páncreas de ratas sacrificadas 30 min después de la inducción de la PA y que se detectaba hidrólisis de GSH tanto en tejido pancreático procesado inmediatamente después del sacrificio, como en tejido congelado.

El resultado obtenido fue que los homogenados de páncreas de las ratas con PA necrótica presentaban una tasa de degradación de GSH significativamente superior a los de ratas control. El análisis de esos mismos extractos citosólicos por HPLC también nos permitió conocer que los extractos citosólicos de ratas con PA presentaban una tasa de formación de glutamato y de cisteína superior a la de los extractos de ratas control. Además, esas tasas de formación eran bloqueadas de manera significativa por el AEBSF.

Al medir la actividad de la γ -GT, única enzima conocida hasta la fecha capaz de degradar el GSH, resultó que había una alta actividad γ -GT en los homogenados. La noticia positiva fue que esa actividad se daba tanto en los homogenados de ratas con PA como en los de ratas control, y

DISCUSIÓN

que la γ -GT era sensible al aumento de acivicina, inhibidor específico de la γ -GT, mientras que el AEBSF no producía ningún efecto en la actividad γ -GT, característica que ya de por sí descartaba a la γ -GT como responsable de la degradación de GSH detectada en la PA. No obstante, decidimos eliminar la interferencia de la γ -GT preparando extractos citosólicos mediante centrifugación a 200.000 *xg* y aumentando la concentración de acivicina a 0,25 mM. Con estas condiciones, se consiguió eliminar la interferencia de la γ -GT de las muestras.

La tasa de degradación de GSH en los extractos citosólicos fue similar a la detectada en los homogenados. Había una tasa de degradación de GSH significativamente mayor en los extractos citosólicos de páncreas de ratas con PA que en los de los controles, y ésta era bloqueada por el AEBSF. Los extractos citosólicos de ratas con PA también presentaban una tasa de formación de glutamato y de cisteína superiores a la de los extractos de ratas control, siendo la tasa de formación de cisteína del orden de la tasa de degradación del GSH, y la de glutamato aproximadamente el doble. Estos resultados indicarían que la cisteína que se forma parece provenir únicamente de su liberación por la hidrólisis de GSH, mientras que en cambio el glutamato podría provenir de la hidrólisis del GSH y de otros procesos metabólicos.

En base a estos resultados pensamos que se está produciendo la liberación de cisteína y de glutamato (al menos la parte inhibible por el AEBSF) por la hidrólisis de GSH, aunque no se podría descartar una sucesión de otros mecanismos que lleven a la formación de ambos aminoácidos. En el caso de que la hipótesis de la hidrólisis de GSH sea la correcta, el o los supuestos responsables podrían producir la ruptura del GSH en sus componentes aminoácidos rompiendo tanto el enlace γ -glutamilo, que une la cisteína al glutamato, como el enlace peptídico que une la cisteína con la glicina. Este hallazgo es importante porque hasta ahora nunca se ha descrito que se pueda degradar el GSH por hidrólisis total de sus enlaces peptídicos liberando cisteína, glutamato y glicina, en ausencia de la γ -glutamil transpeptidasa.

DISCUSIÓN

Después de eliminar a la γ -GT como responsable de la hidrólisis de GSH en la PA, otras candidatas eran la carboxipeptidasa B (CPB) y la tripsina, enzimas pancreáticas que participan activamente en la digestión de proteínas por su extremo carboxilo. Estas enzimas actúan preferentemente sobre aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina), aunque potencialmente podrían ser capaces de degradar el GSH por una actuación menos específica. Sin embargo, a pesar de saber que la tripsina es inhibible por el AEBSF, también es inhibida por otros inhibidores de proteasas presentes en el cóctel como E64 y aprotinina, los cuales fueron incluidos en el tampón de homogenización de los extractos citosólicos, y en el caso de CPB, el AEBSF no afecta a su actividad. Además ni la CPB ni la tripsina, ambas activas en tampón fosfato potásico 0,1M y a pH 7,4, condiciones experimentales utilizadas para la determinación de la tasa de degradación de GSH, produjeron depleción alguna del GSH. Estos resultados descartaban a la CPB y a la tripsina como posibles responsables de la degradación de GSH.

Por tanto tres de las enzimas potencialmente capaces de degradar GSH (γ -GT, CPB y tripsina) no eran responsables de la hidrólisis de GSH detectada en el inicio de la PA.

2.1. Identificación de posibles responsables de la hidrólisis de GSH en la PA necrótica.

Una vez caracterizada la degradación de GSH en la PA *in vivo* y su prevención por el AEBSF, y de descartar a la γ -GT, a la CPB y a la tripsina, quedaba intentar acotar el número de enzimas candidatas. Estas enzimas pueden ser representantes de distintas familias enzimáticas, como transferasas o proteasas/peptidasas, aunque nuestras expectativas se decantaban a favor de una peptidasa ya que además de inhibir la degradación de GSH y la formación de cisteína y glutamato, el AEBSF es un inhibidor de serín peptidasas. No obstante, también podrían ser otras enzimas inhibibles por el AEBSF como la NADPH oxidasa.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos hasta ese momento eran claros, pero la posibilidad de que las condiciones elegidas para hacer las determinaciones no fuesen las idóneas existía, aunque éstas se eligieron de manera cautelosa en base a la información disponible sobre enzimología. Por tanto, para avanzar en la caracterización del responsable de la hidrólisis de GSH era preciso intentar nuevos métodos para obtener nuevos hallazgos que facilitaran el estudio.

2.1.1. Cromatografía de afinidad de proteínas afines al GSH y al AEBSF.

Para abordar el problema tuvimos en mente dos posibilidades, una era recurrir a análisis bioinformáticos e intentar encontrar alguna secuencia proteica similar a la γ -GT con posibilidades de hidrolizar el GSH, estrategia muy difícil de llevar a cabo por nuestro grupo, y la otra era por cromatografía de afinidad utilizando las pocas características conocidas sobre el responsable, que es su afinidad por el GSH y por el AEBSF.

Por tanto nos decantamos por la segunda opción. El diseño de la cromatografía de proteínas afines al AEBSF fue complejo, ya que no está comercializada. En el caso de la cromatografía de afinidad al GSH, si se comercializa (BugBuster GST kit, Calbiochem), y la fase estacionaria está compuesta por una resina que retiene proteínas afines al GSH, y por lo tanto, sólo tuvimos que cargar los extractos citosólicos en columnas con este tipo de resina. Para construir una fase estacionaria afin al AEBSF decidimos biotinilar el AEBSF por el grupo amino (NHS-biotin, Thermo scientific), incubarlo con los extractos citosólicos y posteriormente aplicarlo a una columna con una fase estacionaria de avidina afin por la biotina.

Una vez obtenidos los eluatos de ambos tipos de cromatografía de afinidad, los analizamos por la técnica de secuenciación proteica MALDI-TOF, con la que se obtuvo la huella peptídica de algunas de las proteínas presentes en los eluatos.

Los resultados obtenidos de estos análisis han resultado cuanto menos esperanzadores, y aunque no han sido suficientes para decir a

DISCUSIÓN

ciencia cierta que es lo que provoca la hidrólisis del GSH al inicio de la PA, si que nos han permitido acotar el campo de trabajo y nos ha desvelado algunas candidatas con posibilidades reales de ser las responsables.

De la cromatografía de proteínas afines al GSH, lo más destacado es la presencia de algunas glutatión-S-transferasas (GSTs) de la familia α , μ y π y de la glutarredoxina (GRx) en los eluatos. Aunque en un principio son enzimas antioxidantes que se inducen por la presencia de ROS/RNS, probablemente jueguen algún papel en el mecanismo de depleción de GSH.

La GST $\pi 1$ podría ser responsable de la hidrólisis de GSH en fibroblastos gingivales humanos (Lefeuvre y cols., 2004), línea celular donde la GST predominante es la GST $\pi 1$. No obstante, en nuestra opinión, la contribución de las GSTs se debería más por conjugación del GSH a otras moléculas que por una degradación directa, aunque no se puede descartar completamente esa posibilidad.

En cambio, como ya se ha comentado en el apartado 1.3.1 de la discusión, la GRx participa en la activación de la ribonucleasa pancreática (Holmgren y cols., 2005), y la abolición del cIR disminuye los niveles de GSH (Monti y cols., 2007). Por tanto, la GRx, que es una enzima importante en la regulación redox de muchos procesos biológicos, podría contribuir activamente no sólo en el fallo de la inducción de la GCL sino también en la disminución del GSH causado por la posible degradación del cIR.

Por otro lado, los resultados más interesantes han sido proporcionados por el análisis de los eluatos de la cromatografía afin a proteínas conjugadas al AEBSF. Estos resultados, además de la ya comentada ribonucleasa pancreática, nos han mostrado la presencia de otras proteínas como el tripsinógeno y la tripsina, ambas esperadas, pero además la ARID 4B (AT-rich interactive domain 4B), que es homóloga a la proteína de unión al retinoblastoma (RBP1), y dos proteínas de origen mitocondrial: la serín peptidasa HTRA3 y la L-arginina: glicina amidino transferasa, AGAT.

De esas tres proteínas, las dos mitocondriales podrían ser responsables directos de la degradación de GSH. La ARID 4B tiene función

DISCUSIÓN

deacetilasa y forma parte del complejo enzimático correpressor de SIN3A (Fleischer y cols., 2003) y está descrito que se une a la proteína mediadora de la apoptosis, APAF-1 (DIP, database interacting proteins), con lo cual parece que la ARID 4B tenga que ver más con el mecanismo de muerte celular producido en el proceso inflamatorio.

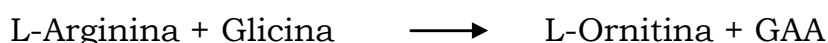
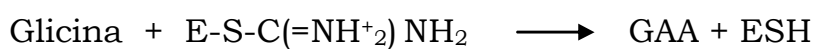
La serín peptidasa HTRA3, o Crc-a, pertenece a una familia proteica altamente conservada, todas homólogas de la proteína HTRA de *E.coli*, también conocida como DEGP. Esta familia está ampliamente distribuida entre procariotas y eucariotas, y participa en la eliminación de proteínas con estructuras aberrantes producidas por ejemplo, por estrés oxidativo o calor (Zurawa-Janicka y cols., 2007). La HTRA de *E.coli* presenta actividad proteasa y función de chaperona (De Luca y cols, 2003) y es inducida por proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*, HSPs) (Pallen y Wren 1997). En humanos al menos han sido encontrados 4 homólogos involucrados en el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis, y sus anomalías pueden inducir carcinogénesis y procesos degenerativos como la artritis o el Parkinson (Zurawa-Janicka y cols., 2007). Las proteínas HTRA presentan al menos un dominio catalítico similar a la tripsina, con otro dominio de interacción proteica PDZ (Vande Walle y cols., 2008) con el que reconocen a las proteínas defectuosas (Pallen y Wren, 1997). El dominio PDZ interacciona con las proteínas por el extremo carboxi terminal. Sobre la HTRA 3, prácticamente no hay datos. Las HTRA 1 y 2 son mitocondriales y aparecen presentes en el espacio intermembranoso mitocondrial; la HTRA2 es requerida para la homeostasis mitocondrial en ratones y en humanos. La HTRA2 es liberada al citosol, donde contribuye a la apoptosis a través de mecanismos caspasa dependientes e independientes (Vande Walle y cols., 2008). Curiosamente se ha descrito que la HTRA también está relacionada con APAF-1, ya que induce la formación del apoptosoma (Cain K, 2003).

La HTRA3 podría ser responsable de la hidrólisis de GSH, debido a ese dominio tríptico y a su liberación al citosol ante un estímulo agresivo, junto con su capacidad de inhibición por el AEBSF.

La L-arginina:glicina amidino transferasa (AGAT) por su parte, es una enzima muy importante en el metabolismo de la creatina. En

DISCUSIÓN

mamíferos, la creatina puede ser adquirida en la dieta, captada por las células con la ayuda de un receptor específico denominado CT1 (Braissant y cols., 2007), o bien puede ser producida endógenamente en una ruta de dos etapas (Braissant y cols., 2007). La AGAT es la enzima limitante en la síntesis endógena de la creatina y cataliza la transferencia de un grupo amidino de la arginina a la glicina. El resultado de esta reacción es la formación de L-ornitina y ácido guanidinoacético (GAA). Esta reacción se produce por un mecanismo de doble desplazamiento o ping-pong (Fritsche y cols., 1997), en donde se genera un intermediario enzimático derivado de la isotiourea. La reacción se produce de la siguiente forma:



Posteriormente, el GAA es convertido en creatina en una segunda etapa dependiente de la metilación de S-adenosil metionina por parte de la enzima guanidinoacético metiltransferasa, GAMT (Walker, 1973). Posteriormente, la creatina es fosforilada por la creatina quinasa para dar fosfocreatina, y por una reacción espontánea es transformada en creatinina que es eliminada por el riñón. En mamíferos, la mayor actividad de AGAT, se produce en riñón, páncreas, hígado (McGuire y cols., 1986; Braissant y cols., 2007), y cerebro (Braissant y cols., 2007). La formación de la fosfocreatina es reversible y genera ADP con gasto de ATP, convirtiéndose en una molécula de elevada energía y comportándose como un reservorio dinámico de energía usado por tejidos con mucho gasto

DISCUSIÓN

energético como el sistema nervioso o el músculo esquelético para generar ATP en condiciones anaeróbicas (Walker, 1973).

A nivel celular, la GAMT se localiza en el citosol (Tachikawa y cols., 2004), y tanto la creatina quinasa (Lenz y cols., 2007) como la AGAT (Fritsche y cols., 1997) se localizan en la mitocondria, en la membrana interna y en el espacio intermembranoso respectivamente, pero también aparecen ambas en el citosol. Se ha sugerido que la fosfocreatina tiene un papel importante en el transporte de energía desde la mitocondria al citosol (Jacobus y Lehninger, 1973; Bessman y Geiger, 1981).

El centro catalítico de AGAT está formado por una triada catalítica, formando una especie de bolsillo iónico, con un par de residuos de histidina y asparragina (His-Asp) a un lado del sustrato, y por el otro un residuo de cisteína que es el que lleva a cabo el ataque nucleofílico, de forma similar a la Cys25 de la cisteín proteasa papaína (Fritsche y cols., 1997). Entre sus sustratos se encuentran donantes de grupos amidinos como la L-canavanina, 4-guanidinobutirato, 3-guanidinopropionato, hidroxiguanidina, y aceptores como la L-canalina, 4-aminobutirato, 3-aminopropionato e hidroxilamina (Walker, 1979). Su actividad es favorecida por la presencia de arginina y sufre una retroinhibición por la L-ornitina que bloquea su actividad (Fritsche y cols., 1997).

La mayor actividad de AGAT se produce en el riñón. Sin embargo, la deficiencia de su actividad producida por fallo renal puede ser compensada por la AGAT pancreática. Se ha descrito que la insulina podría controlar la síntesis de GAA en las células acinares por estimulación de la síntesis de la AGAT pancreática (Hirata, 1989).

En relación con el estrés oxidativo, se ha comprobado que niveles extremadamente altos de GAA y de otros compuestos guanidínicos endógenos, así como de la arginina, generan radicales hidroxilo en enfermedades como la epilepsia o la uremia, sugiriendo que la acumulación de compuestos guanidínicos o de arginina en neuronas o nefronas provocaría el daño mediado por ROS en esas patologías (Mori y cols., 1996). Recientemente, se ha publicado que las quinasas mitocondriales, como la mt-hexoquinasa y la mt-creatina quinasa, a través

DISCUSIÓN

de un mecanismo que implica el reciclamiento de ADP, actúan como antioxidantes en mitocondrias con baja actividad peroxidasa, complementando a las enzimas antioxidantes clásicas (Santiago y cols., 2008).

La actividad de AGAT se observa en mayor medida en riñón y páncreas, que curiosamente también son dos de los tejidos más susceptibles de sufrir necrosis. AGAT podría jugar un papel importante en la PA haciendo disminuir los niveles de GSH al inicio y en etapas posteriores de PA graves. En este sentido, se ha descrito que se puede dar una forma amidina-cíclica del GSH originada por conjugación de tiazolin y GSH (Fujii, 1992). La AGAT podría ser responsable de una hidrólisis directa sobre el GSH, o bien podría catalizar la formación de algún metabolito secundario a excretar posteriormente (Iyer y cols., 1997).

Existen varios trabajos que involucran a la AGAT en la PA. Así, se ha comprobado que entre las enzimas pancreáticas liberadas se encuentra la AGAT (Grigorevskii y cols., 1989) y se ha sugerido que para el diagnóstico de la pancreatitis aguda junto con la determinación de la actividad de las enzimas fosfolipasa A₂ y lipasa, también podría detectarse el aumento de actividad AGAT en sangre (Dalgat y cols., 1986). Se ha publicado recientemente que la presencia de inhibidores naturales de AGAT, tales como la tiourea y sus derivados, mercaptopurinas, o mercapto-derivados del imidazol, en sangre de pacientes con PA, se considera un factor de pronóstico favorable (Butkevich y cols., 2007). Además, la síntesis intracelular de poliaminas está regulada por la enzima ornitina decarboxilasa, y su inhibición confiere resistencia celular a la apoptosis mediada por ERK 1/2 y el receptor del factor de crecimiento endotelial, EGFR, en células del epitelio intestinal (Ray y cols., 2007). También se ha descrito que la creatinina sérica junto con un exceso de bases y un aumento de LDH es buen indicador de muerte temprana en enfermos con PA (Shinzeki y cols., 2008).

En base a nuestros resultados, en los que hemos determinado la presencia de las enzimas AGAT y HTRA3 en el citosol de células pancreáticas durante la PA necrótica y su afinidad por el AEBSF, inhibidor de la degradación de GSH en la PA, podemos sugerir que alguna de estas

DISCUSIÓN

enzimas sea responsable en cierta medida de la disminución del GSH, bien por hidrólisis directa o bien por conjugación.

Además de estas proteínas, los análisis MALDI-TOF nos han aportado una gran cantidad de péptidos no asignados a ninguna secuencia proteica incluida en las bases de datos habitualmente utilizadas. El análisis de esos péptidos debería hacerse mediante estudios bioinformáticos y antes de empezar, se debería descartar a la AGAT y la HTRA3 como efectoras de la degradación de GSH en la PA. En cualquier caso podemos destacar que en esta tesis hemos esclarecido algunos aspectos sobre el mecanismo de degradación del GSH, a partir de los cuales poder optimizar las condiciones de las futuras determinaciones, e incluso hemos acotado el campo de investigación orientado a la búsqueda de posibles candidatas. Otro hecho digno de ser estudiado más en profundidad es la implicación de éstas y otras enzimas mitocondriales en la evolución de la PA.

3. BASES MOLECULARES DE LA CASCADA INFLAMATORIA EN LA PANCREATITIS AGUDA.

La respuesta celular en la PA depende, entre otros factores, de los mecanismos enfrentados de síntesis y depleción de GSH. Existen evidencias que indican que esos mecanismos, en los que como hemos visto participan un compendio de moléculas sulfhidríticas, enzimáticas y no enzimáticas, están regulados por el estado redox tiólico celular. El desequilibrio de la homeostasis tiólica en etapas muy tempranas de la PA origina una disminución de las defensas antioxidantes y un aumento de la actividad de enzimas pro-oxidantes que favorecen la generación de los ROS/RNS (Dabrowski y cols., 1992), responsables al menos en parte de la activación de la cascada inflamatoria (Shi y cols., 2005). En el inicio de la

DISCUSIÓN

PA necrótica en ratas, junto con la toxicidad de los ROS/RNS, se produce una disminución de los grupos sulfhidrilos totales intra- y extracelulares (Cui y cols., 2007), tanto en el páncreas como en el pulmón (Dabrowski y cols., 1992). Las ratas supervivientes pasadas las primeras 24 h desde la inducción de la PA, presentan una recuperación de los niveles de MDA a sus niveles basales, aunque los niveles de grupos sulfhidrilos totales se mantienen deplecionados (Dabrowski y cols., 1992).

Por tanto, debido a la importancia de esa homeostasis redox tiólica en la regulación de los mecanismos implicados en la PA, el papel del GSH se torna clave modulándola de manera muy fina. El estado tiólico-redox de las enzimas implicadas en el metabolismo del GSH va a derivar en su activación de manera muy dinámica y en función de la intensidad del estrés asociado a la PA. Esos cambios dinámicos del estado tiólico-redox de las enzimas favorecerán o dificultarán la recuperación de los niveles de GSH, siendo en último término el GSH el encargado de normalizar la homeostasis tiólica-redox. Todo apunta al GSH como posible interruptor de la cascada inflamatoria en la PA, de manera que su depleción mantenida podría contribuir a la aparición del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y el síndrome de disfunción multiorgánica (MODS). Además, por el papel determinante del GSH en otras enfermedades inflamatorias distintas a la PA, puede que esa modulación realizada por el GSH se diera en numerosos procesos fisiopatológicos y que, en condiciones basales, los niveles adecuados de GSH se modulen por retroalimentación negativa manteniendo el equilibrio redox celular.

Inmediatamente después de la disminución de los niveles de GSH, se ocasiona la acumulación de ROS/RNS lo cual va a contribuir a la activación de la cascada inflamatoria y a la amplificación de su señal. La PA se caracteriza por la formación de edema junto a la migración de los leucocitos hacia el tejido pancreático (Closa y cols., 1999). Los ROS/RNS originados localmente en el páncreas van a mediar esa migración induciendo la liberación de factores quimiotácticos por neutrófilos y atrayendo cada vez a más células inflamatorias (Pereda y cols., 2006). Uno de los principales factores que favorece la migración de células

DISCUSIÓN

inflamatorias desde la sangre al tejido pancreático es ICAM-1, que está sobreexpresada durante la inflamación (Dabrowski y cols., 2008). Existen numerosas pruebas que demuestran la liberación de citoquinas en la PA. Por ejemplo, los macrófagos activados liberan citoquinas proinflamatorias en respuesta al daño pancreático (Viterbo y cols., 2008) y los niveles séricos de IL-1 β , IL-6 y TNF- α aumentan en la evolución de la PA correlacionándose sus niveles con el grado de inflamación (Vinokurova y cols., 2006).

El TNF- α es otro protagonista importante de la inflamación, ya que induce la expresión y activación de factores de transcripción como NF- κ B que a su vez actúa aumentando la expresión del mismo TNF- α y otras citoquinas (Pereda y cols., 2006; Hirata y cols., 2008). La principal fuente de TNF- α en el páncreas durante la PA son los leucocitos, aunque pueden ser generados por otras células como las acinares. Horas más tarde al aumento de TNF- α en el páncreas, se induce su expresión a nivel de ARNm y proteína en hígado, bazo y pulmón (Pereda y cols., 2006). El TNF- α influye a su vez en la severidad de la PA induciendo la apoptosis o la necrosis de las células acinares (Norman, 1998).

Se puede decir que el TNF- α y el estrés oxidativo se potencian mutuamente durante la PA, ya que si bien el estrés oxidativo provoca el aumento de TNF- α , el propio TNF- α induce la generación de estrés oxidativo a través de diferentes mecanismos, como la conversión de xantina deshidrogenasa en XO en células endoteliales (Friedl y cols., 1989), o incrementando la producción de ROS mitocondrial (Adamson y Billings, 1992).

La comunicación entre el estrés oxidativo y las citoquinas inflamatorias en respuesta a señales extracelulares está orquestada por la activación de las rutas de señalización de las MAPK (Cho y cols., 2003; Tripathi y cols., 2008), que pueden provocar en última instancia la muerte celular por apoptosis (Wada y Penninger, 2004) o por necrosis (Zhuang y cols., 2008). Las tres vías de las MAPK están sujetas a una estrecha regulación de tal manera que su activación/inactivación se produce de manera reversible por fosforilación/defosforilación.

DISCUSIÓN

3.1 MAPK en la Pancreatitis aguda. Papel de MEK 1/2 y de las proteínas fosfatasa.

Estudios sobre la fosforilación de las MAPK en el transcurso de la PA realizados previamente por nuestro grupo investigador revelaron que en condiciones basales la fosforilación de las tres MAPK, ERK 1/2, p38 y JNK 1/2, es baja en páncreas y después de la inducción de la PA necrótica en ratas se produce una rápida activación de las tres MAPK. Como se puede apreciar en el apartado 1.4. de resultados, el máximo de fosforilación de ERK 1/2 aparece media hora post-inducción de la PA. Esa fosforilación tan pronunciada disminuye rápidamente a la mitad a la media hora después del máximo de fosforilación, disminuyendo posteriormente a lo largo del tiempo pero de manera mucho más tenue y progresiva. A las 6 horas la fosforilación de las MAPK ya se ha reducido sensiblemente aunque aún presenta cierta fosforilación en comparación con los controles. Otros grupos de investigación también han constatado la activación de las MAPK en la PA inducida tanto por ceruleína como por taurocolato (Samuel y cols., 2008; Sarmiento y cols., 2008).

En esta tesis, además de ver la activación de ERK 1/2, se han estudiado los mecanismos implicados en la regulación de la activación de ERK 1/2, que junto con JNK parecen ser las dos principales MAPK mediadoras de la inflamación en la PA (Sarmiento y cols., 2008). Por un lado, hemos comprobado que MEK 1/2 aparece activada de manera intensa y temprana en la pancreatitis aguda. El estudio de la evolución temporal de la activación de MEK 1/2 en ratas con PA necrótica reveló que presentaba un máximo de activación a la media hora de la inducción de la PA y que se mantiene en el tiempo durante al menos 6 h desde el inicio de la pancreatitis. Por tanto, existen diferencias en la cinética de fosforilación entre la enzima efectora de la activación de ERK 1/2 y su propia activación.

Desde que Krebs y Fisher revelaran la importancia de la fosforilación en el metabolismo del glucógeno (Krebs y Fischer, 1956), el

DISCUSIÓN

papel de las proteínas quinasas ha focalizado la atención de innumerables investigaciones científicas en el último medio siglo y más recientemente se le ha empezado a prestar una mayor atención al papel de las fosfatasa.

En la actualidad se conocen aproximadamente medio millar de quinasas por sólo unas 140 fosfatasa (Arena y cols., 2005). Las quinasas, al igual que otras biomoléculas, son susceptibles de sufrir su activación e inducir la activación de sus sustratos por transferencia de la energía en forma de grupos fosfato. Entre sus sustratos se encuentran en muchos casos otras quinasas las cuales se van a comportar de igual manera pudiendo convertirse en un círculo vicioso. El menor número de fosfatasa, enzimas encargadas de regular la fosforilación sufrida por las quinasas, y en muchos casos a la necesidad de su rápida actuación para impedir la unión de las quinasas a sus sustratos, da pie a pensar que la actividad global de las fosfatasa es elevada en condiciones basales, al menos del orden de la actividad global de fosforilación o superior. Uno de los principales sustratos de las fosfatasa es ERK 1/2, de manera que la función de éstas es la de mantener el estado fosforilativo de ERK 1/2 en unos niveles insuficientes como para disparar su activación y sus efectos en condiciones basales. El desajuste en la regulación de ERK 1/2 mediada por las fosfatasa y en respuesta a un estímulo extracelular puede acarrear la activación de ERK 1/2 y el inicio de distintos procesos fisiopatológicos.

3.1.1. Regulación de ERK 1/2 por proteínas fosfatasa en la pancreatitis aguda.

La activación de ERK 1/2 no ocurre solamente por fosforilación a través de MEK 1/2 en respuesta a un estímulo, sino que también está regulada por la acción de un tipo de tirosín fosfatasa, llamadas fosfatasa de especificidad dual (DSP) o también MKPs, porque actúan específicamente sobre las MAPK. Está descrito que las MKPs aumentan su expresión de manera muy temprana en el inicio de la PA inducida por ceruleína (Höfken y cols., 2000) y además han sido involucradas en los efectos beneficiosos que produce el receptor 2 activado por proteasas (PAR2) en la pancreatitis inducida por ceruleína (Namkung y cols., 2008).

DISCUSIÓN

PAR2 pertenece a una de las 7 familias de receptores de membrana acoplado a proteína G, liberado y activado por la tripsina, con propiedades tanto proinflamatorias como anti-inflamatoria que en la PA severa media complicaciones sistémicas y en la PA leve protege contra el daño intrapancreático (Namkung y cols., 2008).

La progresiva defosforilación de ERK 1/2 en el tiempo durante la PA podría estar mediada por las MKPs como un intento por parte de las células acinares de recuperar la normalidad. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en esta tesis sobre la actividad de las MKP2 y la MKP3, dos de las MKPs más estrechamente relacionadas con la regulación sobre ERK 1/2, cuyas actividades no disminuyen tras la inducción de la PA necrótica: en la PA necrótica, al menos estas dos MKPs, están defosforilando ERK 1/2.

Por otro lado, resultados sobre el tratamiento de la PA necrótica con pentoxifilina mostraban que este fármaco prevenía la reducción de la fosforilación de ERK 1/2, sin causar ningún efecto sobre la fosforilación de MEK 1/2 (véase apartado 4 de la discusión), haciendo suponer que la regulación de ERK 1/2 en la PA necrótica no es tan simple como su activación a través de MEK 1/2 y su inactivación por defosforilación mediada por las MAPK fosfatasas. Así la activación de ERK 1/2, al igual que la de otras muchas quinasas (Gonze y Goldbeter, 2000), puede estar mediada por un mecanismo algo más sofisticado en el que probablemente, además de MEK 1/2 y de las MKPs, entran en juego otras fosfatasas como las ser/tre fosfatasas y las tirosín fosfatasas (PTPs), que de una manera dinámica alternan el protagonismo controlando la fosforilación de ERK 1/2.

La implicación de distintas fosfatasas en la PA ha sido descrita por diversos autores, como por ejemplo la interacción de las MAPK con la tirosín fosfatasa de membrana CD45 (Arimura, 2001), la defosforilación de JNK mediada por la ser/thr fosfatasa PP1 (Brichese y cols., 2004), o el aumento en la expresión de las MKPs, de manera muy temprana en el inicio de la PA inducida por ceruleína (Höfken y cols., 2000). Así mismo, se ha descrito que tres de las fosfatasas que más especificidad presentan por ERK 1/2 son la tirosín fosfatasa hematopoyética, HePTP, la PP2A (Zhou y

DISCUSIÓN

cols., 2002) y la calcineurina (Ikeda y cols., 2006). Además, la inhibición de las PTPs participa en la formación del edema en el páncreas durante la PA (Schnekenburger y cols., 2005), y el bloqueo de CD45 parece afectar a la producción de TNF- α (De Dios y cols., 2006).

Por tanto, el siguiente propósito de esta tesis fue estudiar la actividad de las PTPs y de las ser/tre fosfatasa *in vivo* para intentar elucidar los mecanismos involucrados en el proceso inflamatorio durante la pancreatitis aguda necrótica inducida por taurocolato sódico.

En el caso de las PTPs, por la mayor complejidad de esta familia enzimática, se determinó la actividad PTP total. En el caso de las ser/tre fosfatasa (PPPs), se determinó la actividad de tres de las cuatro enzimas que componen la familia PPP, la PP2A, la PP2B (calcineurina) y la PP2C. Las actividades de las PPPs y de las PTPs se detectaron en el citosol, ya que todas las muestras de páncreas de rata fueron centrifugadas a 100.000 xg durante 1 h, descartando las PTPs de membrana.

En el caso de las PPPs, las actividades de la PP2A, PP2B y PP2C disminuían de manera significativa en las muestras de páncreas de ratas con PA necrótica respecto a las de ratas control. Las determinaciones se realizaron a un solo tiempo, 1 hora post-inducción, tiempo apropiado para detectar esta significativa disminución.

Las determinaciones de la actividad PTP pancreática se realizaron a distintos tiempos después de inducir la pancreatitis para ver su evolución. Se detectó una pérdida significativa de la actividad PTP a 1 h post-inducción respecto a los controles y a lo largo del tiempo se recuperaba la actividad, de manera que a las 6 h post-inducción la actividad ya es similar a la presentada por los controles. Estos resultados se asemejan a los de un estudio realizado por el grupo de Lerch en que describieron la importancia de las PTPs citosólicas regulando el mantenimiento y la reconstitución de las adhesiones intercelulares en el páncreas (Schnekenburger y cols., 2005).

En esta parte de la tesis, centrada en la regulación de ERK 1/2, se ha prestado especial atención al efecto que sobre ella produce la activación o inhibición de la PP2A. Esta enzima es una de las principales reguladoras

DISCUSIÓN

del nivel de fosforilación de ERK 1/2 de acuerdo a numerosas publicaciones científicas (Zhou y cols, 2002; Adams y cols, 2005; Ho y cols, 2007). Muchos datos implican a la fosfatasa PP2A en la activación de ERK 1/2 en cooperación con la proteína quinasa II Ca/calmodulin en la regulación de canales $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ (Allen y cols, 2007), hecho interesante teniendo en cuenta el movimiento de Ca^{2+} que se produce durante la PA.

Otro aspecto que nos llamó la atención sobre la PP2A es que su inhibición está relacionada también con el estrés oxidativo, ya que el H_2O_2 inhibe la actividad de la PP2A sin afectar a la actividad de la PP1 o la PP2C (Rao y Clayton, 2002). En condiciones oxidativas, la subunidad catalítica de la PP2A se puede inactivar por formación de puentes disulfuro intramoleculares con tioles de su centro activo y pequeñas variaciones en la homeostasis tiólica pueden conducir a su activación o inhibición (Foley y cols., 2007). También es susceptible de glutationilación, ya que el GSSG la inhibe y el GSH la activa (Rao y Clayton, 2002).

Por su relación con el estrés oxidativo, la homeostasis redox, el movimiento de Ca^{2+} y su acción sobre ERK 1/2, podrían jugar un papel clave tanto en fases tempranas de la PA como en su evolución hacia formas más severas de la enfermedad, participando de manera esencial en el control de la cascada inflamatoria.

Estudios cinéticos de la actividad PP2A desarrollados *in vitro*, muestran que el taurocolato sódico a una concentración de 0,3 % induce una muy rápida disminución de la actividad PP2A que se va recuperando con el tiempo sin producir una mortalidad significativa. La disminución de la actividad PP2A puede observarse a los 5 min de la adición del taurocolato, pero a los 15 min ya ha recuperado la actividad basal, manteniéndola al menos otros 15 min más, que son los tiempos que hemos medido en este trabajo.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de las actividades de las PPPs y PTPs en el transcurso de la PA necrótica, en donde parecen estar sometidas a fluctuaciones en su actividad reguladora sobre los distintos mediadores de la inflamación, y todo ello sugiere que la PP2A está finamente modulada para responder a señales de estrés.

4. MODULACIÓN DE LA CASCADA INFLAMATORIA DE LA PANCREATITIS AGUDA CON PENTOXIFILINA.

Numerosos mediadores de la inflamación como enzimas pancreáticas activadas, citoquinas, radicales libres, el factor activador plaquetario, factores neurogénicos, adenosina o Ca^{2+} han sido relacionados con la PA (Denham y cols., 1997; Grady y cols., 1996; Bhatia y cols., 2005; Pereda y cols., 2006), por lo que el esclarecimiento de los mecanismos de las rutas de señalización intracelular implicadas en la PA, están todavía poco claros. Las MAPK están consideradas el mayor transductor de la señal inflamatoria en etapas tempranas de la PA (Höfken y cols., 2000). La activación de las MAPK requiere la fosforilación de un residuo de treonina y otro de tirosina, mediado por las MAPKK, de manera que la intensidad y duración de la fosforilación de las MAPK puede determinar sus efectos biológicos (Marshall, 1995). La inhibición de la quinasa p38 disminuye el daño pancreático y pulmonar en la PA severa en ratas (Yang y cols., 1999), y el bloqueo simultáneo de las tres principales MAPK, ERK 1/2, JNK y p38 por la pentoxifilina y el oxipurinol reduce de manera considerable la respuesta inflamatoria local y sistémica en la PA, así como la mortalidad (Pereda y cols., 2004).

La pentoxifilina presenta marcadas propiedades anti-inflamatorias mediadas principalmente por la inhibición de la producción de $\text{TNF-}\alpha$ (Schandené y cols., 1992), así como por la reducción de la fosforilación de ERK y JNK (Pereda y cols., 2004). La administración de pentoxifilina muestra efectos beneficiosos tanto en la PA necrótica como en la edematosa (Gómez-Cambronero y cols., 2000; Pereda y cols., 2004). Más recientemente, se ha descrito que la pentoxifilina reduce el índice de daño pancreático, los niveles de lipasa y amilasa y el estrés oxidativo en la PA edematosa inducida por ceruleína en ratas (Gül y cols., 2008).

En esta tesis se ha investigado la defosforilación de ERK 1/2 inducida por el tratamiento con pentoxifilina en la PA necrótica, a la cual

DISCUSIÓN

se le atribuyen muchos de los efectos beneficiosos de la pentoxifilina. En primer lugar se prestó atención al posible efecto de la pentoxifilina sobre la fosforilación de MEK 1/2, MAPKK responsable de la fosforilación de ERK 1/2, sin observar reducción alguna de la fosforilación de MEK 1/2 producida como consecuencia del tratamiento con la pentoxifilina. Este resultado apuntaba a que el efecto de la pentoxifilina no se producía por bloqueo de la activación directa de ERK 1/2, actuando sobre algún integrante de la vía de inactivación de ERK. El resultado no dio lugar a ninguna duda, y aunque era contrario a nuestras expectativas, nos hizo pensar en nuevas posibles dianas de la pentoxifilina implicadas en el desarrollo de la PA, entre las cuales se encontraban en primera instancia las fosfatasas.

4.1. Efecto de la pentoxifilina sobre las serín/treonín fosfatasas.

La pentoxifilina inhibe las actividades fosfodiesterasas (PDE), efecto mediado al menos en parte por un mecanismo independiente de la vía de la PKA (Deree y cols., 2008). Esa inhibición de la actividad PDE es la causante de la disminución de la producción de TNF- α , ya que da lugar a la acumulación del segundo mensajero adenosina-3,5-monofosfato cíclico, AMPc (Endres y cols., 1991), el cual induce eventos a nivel citoplasmático y nuclear como la atenuación de NF- κ B y la activación del elemento de unión en respuesta al AMPc, CREB (Deree y cols., 2008).

En relación con las fosfatasas, está descrito que el AMPc causa una marcada reducción en la fosforilación de numerosas fosfoproteínas (Feschenko y cols., 2002) y que puede aumentar la actividad de algunas PPPs, como la calcineurina (Webster y cols., 2002) o la PP2A (Feschenko y cols., 2002). Por esta razón, decidimos investigar el efecto de la pentoxifilina sobre la disminución que observábamos en la actividad de las PPPs, PP2A, PP2B y PP2C durante la PA necrótica en ratas. El resultado fue que la pentoxifilina prevenía específicamente la reducción de la actividad PP2A.

DISCUSIÓN

Después realizamos estudios *in vitro* para ver si el efecto de la pentoxifilina sobre la actividad PP2A estaba mediado por el AMPc. Por un lado, determinamos la concentración de AMPc en células AR42J incubadas con taurocolato sódico al 0,3% en presencia y en ausencia de pentoxifilina, y vimos que en las células incubadas con taurocolato disminuían de forma transitoria los niveles de AMPc respecto a los controles, mientras que en las células incubadas con taurocolato sódico y pentoxifilina los niveles de AMPc se mantenían en el rango de los controles. Por otro lado, medimos la actividad PP2A en células incubadas con el taurocolato sódico en presencia de pentoxifilina y de dibutiril AMPc como control del efecto del AMPc. El resultado fue que a los 5 min, tiempo en el que habíamos observado la marcada reducción de la actividad PP2A inducida por el taurocolato *in vitro*, la pentoxifilina prevenía ese descenso de la actividad PP2A y el dibutiril AMPc reproducía los efectos de la pentoxifilina. Esto nos confirmaba que los efectos producidos por la pentoxifilina sobre la actividad PP2A estaban mediados por el AMPc.

Por tanto, podemos decir que durante la PA la pentoxifilina produce la defosforilación de ERK 1/2, al menos en parte, a través de la prevención del descenso de la actividad PP2A, pudiendo ser reponsable de algunos de los efectos beneficiosos de la pentoxifilina en la regulación de la respuesta inflamatoria. Esto podría ser importante por ejemplo a la hora de elegir el tiempo en el que hay que aplicar el tratamiento con la pentoxifilina, ya que si no se hace en el momento adecuado podría ir en desfase con la rápida disminución de la actividad PP2A posiblemente minimizando los efectos beneficiosos de la pentoxifilina durante la PA. Además se ha de tener en cuenta el posible efecto que la pentoxifilina podría tener sobre otras fosfatasas de la familia tirosín fosfatasas (PTPs), las cuales también están involucradas en la PA. En un futuro se debería intentar descubrir qué PTPs presentan alterada su actividad en la PA y cuál es el efecto de la pentoxifilina sobre ellas.

Además, las fosfatasas, al contrario que muchas otras proteínas como la RNasa pancreática, son susceptibles de inhibición reversible en condiciones oxidativas. La oxidación de residuos de cisteína en sus centros activos hace que se formen puentes disulfuros intermoleculares con otras

DISCUSIÓN

proteínas o intramoleculares entre sus subunidades en el caso de la PP2A (Foley y cols., 2007) o con cisteínas adyacentes al centro activo con en el caso de las PTPs (Den Hertog y cols., 2005). Esto es importante en base a resultados de nuestro grupo de investigación (que no se han presentado en esta tesis por estar en estos momentos bajo estudio) en los que muestran cómo la pentoxifilina es capaz de prevenir la depleción de GSH en la PA necrótica. Este resultado, junto con el aumento de los niveles de AMPc, podría ser otra de las aportaciones de la pentoxifilina sobre la regulación de la PP2A y conectaría la disminución de GSH que se produce en la PA con la aparición y el desarrollo del proceso inflamatorio.

4.2. Efectos epigenéticos de la pentoxifilina en el transcurso de la pancreatitis aguda experimental. Remodelación de la cromatina.

En esta Tesis también se ha analizado si los efectos beneficiosos obtenidos con el tratamiento de la pancreatitis aguda necrótica con pentoxifilina podrían estar mediados por cambios a nivel epigenético. Para ello, se realizaron estudios por inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP) para ver el efecto de la pentoxifilina sobre la unión de las histona acetiltransferasas CBP y PCAF, y del complejo histona deacetilasa Sin3A-HDAC1, a los promotores de los genes *egr-1*, *icam-1*, *inos-2* y *tnf- α* , durante la pancreatitis aguda.

Los resultados muestran que en la pancreatitis aguda necrótica se produce la unión del complejo HDAC y de la HAT CBP al promotor del gen de respuesta temprana *egr-1* y que la pentoxifilina bloquea la unión de ambas. La unión del complejo HDAC, disminuye así el nivel de acetilación en las histonas produciendo la disminución de la expresión de *egr-1* a las 3 h después de la inducción, tiempo elegido para los sacrificios. En el caso del gen tardío *icam-1*, la pentoxifilina no impide la unión de la SIN3A-HDAC1 a su promotor, aunque sí bloquea el reclutamiento de las HATs CBP y PCAF, lo cual conduciría también a la disminución en el nivel de

DISCUSIÓN

acetilación en las histonas y a la represión del gen. En el caso de *inos-2*, otro gen tardío, en la pancreatitis aguda necrótica se produce la unión de la HTA CBP al promotor y aunque la pentoxifilina no bloquea esa unión (incluso la aumenta un poco), la unión del complejo SIN3A-HDAC1 inducida en la PA no se haya impedida. Además, en la pancreatitis aguda necrótica se produce la unión tanto de las HTAs CBP y PCAF como del complejo HDAC al promotor de *tnf- α* y la pentoxifilina, que como se sabe es un inhibidor de la expresión de *tnf- α* , produce el bloqueo de la unión de las HAT a su promotor. Quizás para el estudio a nivel transcripcional de genes tempranos se deberían realizar a tiempos más cortos tras la inducción de la PA para conocer el orden preciso de reclutamiento/liberación de los complejos modificadores de la cromatina. No obstante el efecto de la pentoxifilina es claro indicando que está perturbando las modificaciones epigenéticas alterando los niveles de acetilación en las histonas, en los promotores de los genes que son decisivos para el desarrollo de la PA necrótica.

Otro aspecto a tener en cuenta por todo lo comentado hasta ahora en esta discusión, es la importancia que puede tener el GSH induciendo modificaciones epigenéticas. En muchos tejidos, más del 50% del GSH es producido por la vía de la transulfuración, y las enzimas implicadas en esta vía están sujetas a alteraciones dinámicas de su expresión y actividad, y cuando esos cambios ocasionan demanda de las reservas tiónicas, el ciclo de la metionina puede verse afectado, produciendo la migración de metabolitos desde el ciclo de la metionina hacia la vía de la transulfuración para una eventual producción de GSH (Hitchler y Frederick, 2007). La entrada de la homocisteína en la vía de la transulfuración producirá que los niveles de metionina y S-adenosil-metionina (SAM) disminuyan. Por tanto, la depleción de GSH disminuye los niveles de SAM en las células y conduce a hipometilación del DNA (Hitchler y Frederick, 2007), produciendo por tanto modificaciones epigenéticas sustanciales en el conjunto de la cromatina de los genes relacionados con el proceso inflamatorio. De la misma manera, probablemente este produciendo modificaciones en la metilación de las histonas, bien directamente o a través del reclutamiento de histona

DISCUSIÓN

metilasas/dimetilasas (HMTs/HDMTs) por la presencia de DNA metilado en los promotores de estos genes. Bajo este punto de vista y en base a todo lo expuesto en esta tesis, se puede pensar que el GSH está involucrado en las modificaciones epigenéticas que ocurren en el transcurso de la PA y la pentoxifilina podría alterarlas, a lo mejor previniendo esa depleción de GSH. No obstante aunque se debería estudiar más en profundidad, lo que parece claro es que tanto la pentoxifilina produce modificaciones epigenéticas al regular el reclutamiento/liberación de complejos modificadores de la cromatina tales como las HATs o HDACs, participando así en la activación y la represión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria.

Por tanto, esta Tesis ha profundizado en el mecanismo de acción de la pentoxifilina que podrían explicar los efectos beneficiosos que su uso terapéutico produce en la pancreatitis aguda experimental. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la pentoxifilina bloquea en gran medida la expresión de genes pro-inflamatorios por varios frentes, tanto a nivel transcripcional promoviendo modificaciones de las histonas, como a nivel de señalización aumentando la concentración de segundos mensajeros como el AMPc, la actividad de fosfatasa como la ser/tre fosfatasa PP2A, y reduciendo la activación de MAPKs como ERK 1/2.

Sin embargo, aún se debe estudiar más en profundidad el efecto de la pentoxifilina sobre los niveles de GSH, sobre otras fosfatasa, en especial tirosín fosfatasa y sobre la metilación del ADN y de las histonas, y el reclutamiento de HMTs y HDMTs a los promotores de estos y otros genes importantes en el desarrollo de la pancreatitis aguda. Puede que la pentoxifilina este mediando una serie de mecanismos reversibles, dinámica y finamente sincronizados, que dependiendo del grado de alteración estén favoreciendo un cuadro clínico más o menos severo en el desarrollo de la pancreatitis aguda.

El día que se consiga desvelar por completo las enzimas integrantes de estos procesos bioquímicos y fisiopatológicos y de descubrir la orquestación a la cual están sujetas, se podrá afinar en la ventana terapéutica no sólo de la PA, sino seguramente también de otras enfermedades donde se produzca un proceso inflamatorio agudo similar.

VI-CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En la pancreatitis aguda edematosa se produce una marcada inducción de la expresión de la glutamato cisteína ligasa mediada por la activación de la vía de señalización de la MAP quinasa ERK 1/2 y el factor transcripcional c-MYC. Esta inducción contribuye a la rápida recuperación de los niveles de GSH.
2. La inducción ineficaz de la glutamato cisteína ligasa que tiene lugar en el páncreas durante la pancreatitis aguda necrótica se debe, al menos en parte, al aumento de la actividad ribonucleasa en el citosol. Esta inducción ineficaz se produce a pesar de la activación de la vía de señalización mediada por ERK 1/2 y c-MYC y contribuye a la depleción mantenida de GSH en la pancreatitis aguda.
3. En extracto citosólico del páncreas de rata con pancreatitis se detecta hidrólisis de GSH. Esta hidrólisis es inhibible por el inhibidor de las serín peptidasas AEBSF (2,4-amino etil bencenil sulfonil fluoruro).
4. Las enzimas carboxipeptidasa B, tripsina y γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT), no parecen ser responsables de la depleción de glutatión en la pancreatitis aguda.
5. Entre las enzimas citosólicas pancreáticas que se purifican mediante cromatografía de afinidad por unión al AEBSF, las principales candidatas potencialmente capaces de degradar el glutatión, son la AGAT (L-arginina: glicina amidino transferasasa) y la serín peptidasa HTRA3 (*high-temperature requirement factor A3*).
6. La inactivación de las serín/treonín fosfatasas y de las tirosín fosfatasas citoplasmáticas contribuye decisivamente a la activación de la ERK 1/2 en el curso de la pancreatitis aguda.
7. La pentoxifilina evita la pérdida de actividad PP2A en páncreas en la pancreatitis. Esta pérdida está mediada por un descenso de los niveles de AMP cíclico y contribuye al reclutamiento de histona acetil transferasas en los promotores de los genes pro-inflamatorios *egr-1*, *icam-1*, *inos-2* y *tnf- α* .

VII-BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adams D.G, Coffee R.L Jr, Zhang H, Pelech S, Strack S, Wadzinski B.E. *Positive regulation of Raf1-MEK1/2-ERK1/2 signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A holoenzymes.* J. Biol. Chem., 280: 42644-42654 (2005).
- Adamson G.M, Billings R.E. *Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes.*, Arch. Biochem. Biophys., 294: 223-229 (1992).
- Aho H.J, Koskensalo S.M, Nevalainen T.J. *Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis.* Scand. J. Gastroenterol., 15: 411-416 (1980).
- Akterin S, Cowburn R.F, Miranda-Vizueté A, Jiménez A, Bogdanovic N, Winblad B, Cedazo-Minguez A. *Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in beta-amyloid toxicity and Alzheimer's disease.* Cell Death Differ., 13: 1454-1465 (2006).
- Allen D, Fakler B, Maylie J, Adelman J.P. *Organization and regulation of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel multiprotein complexes.* J. Neurosci., 27: 2369-2376 (2007).
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. *Protein tyrosine phosphatases in the human genome.* Cell, 117: 699-711 (2004).
- Ananieva O, Darragh J, Johansen C, Carr J.M, McIlrath J, Park J.M, Wingate A, Monk C.E, Toth R, Santos S.G, Iversen L, Arthur J.S. *The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling.* Nat. Immunol., 9: 1028-1036 (2008).
- Anway M.D, Wright W.W, Zirkin B.R, Korah N, Mort J.S, Hermo L. *Expression and Localization of Cathepsin K, In Adult Rat Sertoli Cells.* Biology of Reproduction, 70: 562-569 (2004).
- Alphey M.S, Hunter W.N. *High-resolution complex of papain with remnants of a cysteine protease inhibitor derived from Trypanosoma brucei.* Acta. Cryst., 62: 504-508 (2006).
- Arena S, Benvenuti S, Bardelli A. *Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer.* Cell Mol. Life Sci., 62: 2092-2099 (2005).

BIBLIOGRAFÍA

- Aricescu A.R, McKinnell I.W, Halfter W, Stoker A.W. *Heparan sulfate proteoglycans are ligands for receptor protein tyrosine phosphatase sigma*. Mol. Cell Biol., 22: 1881-1892 (2002).
- Arimura Y, Ogimoto M, Mitomo K, Katagiri T, Yamamoto K, Volarevic S, Mizuno K, Yakura H. *CD45 is required for CD40-induced inhibition of DNA synthesis and regulation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 in BAL-17 B cells*. J. Biol. Chem., 276: 8550-8556 (2001).
- Asensi M, Sastre J, Pallardo F.V, Lloret A, Lehner M, Garcia-de-la Asuncion J, Viña J. *Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage*. Methods Enzymol., 299: 267-276 (1999).
- Ashwell JD. *The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system*. Nat. Rev. Immunol., 6: 532-540 (2006).
- Auld D. S. *Carboxypeptidase A*. Handbook of Proteolytic Enzymes, 1321-1326, Barrett A.J., Rawlings N.D. y Woessner J.F. (eds), Academic Press, San Diego (1998).
- Auld D. S. *Carboxypeptidase A2*. Handbook of Proteolytic Enzymes, 1326-1328, Barrett A.J., Rawlings N.D. y Woessner J.F. (eds), Academic Press, San Diego (1998).
- Austin J.L, Roberts C, Rosenholtz M. J and Reber H.A. *Effects of partial duct obstruction and drainage of pancreatic function*. J. Surg. Res., 28: 426-433 (1980).
- Authier F, Mort J.S, Bell A.W, Posner B.I, Bergeron J.J. *Proteolysis of glucagon within hepatic endosomes by membrane-associated cathepsins B and D*. J. Biol. Chem., 270: 15798-15807 (1995).
- Avilés F.X., Vendrell J. *Carboxypeptidase B*. Handbook of Proteolytic Enzymes, 1333-1335, Barrett A.J., Rawlings N.D. y Woessner J.F. (eds), Academic Press, San Diego (1998).
- Barnard EA. *Biological function of pancreatic ribonuclease*. Nature, 221: 340-344 (1969).
- Baron J, Voigt J.M, Whitter T.B, Kawabata T.T, Knapp S.A, Guengerich F.P, Jakoby W.B. *Identification of intratissue sites for xenobiotic activation and detoxification*. Adv. Exp. Med. Biol., 197: 119-144 (1986).

BIBLIOGRAFÍA

- Bassi D.G, Foitzik T, Rattner D.W, Lewandrowski K, Warshaw A.L, Fernández-del Castillo C. *Failure of pentoxifylline to ameliorate severe acute pancreatitis in the rat: results of a prospective, randomized, controlled study.* Crit. Care Med., 22: 1960-1963 (1994).
- Benassi B, Fanciulli M, Fiorentino F, Porrello A, Chiorino G, Loda M, Zupi G, Biroccio A. *c-MYC phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress.* Mol. Cell, 21: 509-519 (2006).
- Bessman S.P, Geiger P.J. *Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle.* Science, 211: 448-52 (1981).
- Bhatia M, Wong F.L, Cao Y, Lau H.Y, Huang J, Puneet P, Chevali L. *Pathophysiology of acute pancreatitis.* Pancreatology, 5:132-144 (2005).
- Bellomo G, Jewell S.A, Orrenius S. *The metabolism of menadione impairs the ability of rat liver mitochondria to take up and retain calcium.* J. Biol. Chem., 257: 11558-11562 (1982).
- Berndt C, Lillig C.H, Holmgren A. *Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system.* Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 292: 1227-1236 (2007).
- Blume-Jensen P, Hunter T. *Oncogenic kinase signalling.* Nature, 411: 355-365 (2001).
- Boleslawski E, Conti F, Sanquer S, Podevin P, Chouzenoux S, Batteux F, Houssin D, Weill B, Calmus Y. *Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcineurin drugs during acute liver allograft rejection.* Transplantation, 77: 1815-1820 (2004).
- Bollen T.L, van Santvoort H.C, Besselink M.G, van Leeuwen M.S, Horvath K.D, Freeny P.C, Gooszen H.G; Dutch Acute Pancreatitis Study Group. *The Atlanta Classification of acute pancreatitis revisited.* Br. J. Surg., 95:6-21 (2008).
- Borrás E, Zaragoza R, Morante M, García C, Gimeno A, López-Rodas G, Barber T, Miralles V.J, Viña J.R, Torres L. *In vivo studies of altered expression patterns of p53 and proliferative control genes in chronic vitamin A deficiency and hypervitaminosis.* Eur. J. Biochem. 270: 1493-1501 (2003).

BIBLIOGRAFÍA

- Boulton T.G, Nye S.H, Robbins D.J, Ip N.Y, Radziejewska E, Morgenbesser S.D, DePinho R.A, Panayotatos N, Cobb M.H, Yancopoulos G.D *ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF*. Cell, 65: 663-675 (1991).
- Braissant O, Bachmann C, Henry H. *Expression and function of AGAT, GAMT and CT1 in the mammalian brain*. Subcell Biochem., 46:67-81 (2007).
- Brandman O, Meyer T. *Feedback Loops Shape Cellular Signals in Space and Time*. Science, 322: 390-394 (2008).
-
- Brichese L, Cazettes G, Valette A. *JNK is associated with Bcl-2 and PP1 in mitochondria: paclitaxel induces its activation and its association with the phosphorylated form of Bcl-2*. Cell Cycle, 3: 1312-1319 (2004).
- Brigelius R, Muckel C, Akerbom T.P.M, Sies H. *Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide*. Biochem. Pharmacol., 32: 2529-2534 (1983).
- Burke T.R, Zhang Z.Y. *Protein-tyrosine phosphatases: Structure, mechanism, and inhibitor discovery*. Biopolymers, 47: 225-241 (1998).
- Butkevich A.Ts, Chadaev A.P, Istratov V.G, Khizriev E.A. *Gas chromatography for diagnosis and prognosis of destructive pancreatitis*. Klin. Med. 85: 43-46 (2007).
- Cain K. *Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome*. Drug Metab. Rev., 35: 337-363 (2003).
- Campos M, Fadden P, Alms G, Qian Z, Haystead TA. *Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography*. J. Biol. Chem., 271: 28478-28484 (1996).
- Camps M, Nichols A, Arkinstall S. *Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function*. FASEB J., 14:6-16 (2000).
- Catalán R.E, Gargiulo L, Martínez A.M, Calcerrada M.C, Liras A. *Protein tyrosine phosphatase activity modulation by endothelin-1 in rabbit platelets*. FEBS Lett., 400:280-284 (1997).

BIBLIOGRAFÍA

- Cataldo A.M, Barnett J.L, Berman S.A, Li J, Quarless S, Bursztajn S, Lippa C, Nixon R.A. *Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early upregulation of the endosomal-lysosomal system.* *Neuron*, 14: 671-680 (1995).
- Chai Y, Koppenhafer S.L, Shoesmith S.J, Pérez M.K, Paulson H.L. *Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro.* *Hum. Mol. Genet.*, 8: 673-682 (1999).
- Chen Z, Hagler J, Palombella V.J, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. *Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway.* *Genes Dev.*, 9: 1586-1597 (1995).
- Chiari, H. *Über selbstverdaung des Menschlichen Pancreas*, *Zeitschrift für Heilkunde* 17: 69-96 (1896).
- Chiarugi P. *PTPs versus PTKs: the redox side of the coin.* *Free Radic. Res.*, 39: 353-364 (2005).
- Cho S.Y, Park S.J, Kwon M.J, Jeong T.S, Bok S.H, Choi W.Y, Jeong W.I, Ryu S.Y, Do S.H, Lee C.S, Song J.C, Jeong K.S. *Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage.* *Mol. Cell Biochem.*, 243: 153-160 (2003).
- Cohen P. *The structure and regulation of protein phosphatases.* *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 453-508 (1989).
- Chvanov M, Petersen O.H, Tepikin A. *Free radicals and the pancreatic acinar cells: role in physiology and pathology.* *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360: 2273-2284 (2005).
- Chou K.C. *Modeling the tertiary structure of human cathepsin-E.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331: 56-60 (2005).
- Coimbra R, Melbostad H, Hoyt D.B. *Effects of phosphodiesterase inhibition on the inflammatory response after shock: role of pentoxifylline.* *J. Trauma.*, 56: 442-449 (2004).
- Closa D, Bardaji M, Hotter G, Prats N, Gelpi E, Fernandez-Cruz L and Rosello-Catafau J. *Hepatic involvement in pancreatitis-induced lung damage.* *Am. J. Physiol.*, 270: G6-13 (1996).

BIBLIOGRAFÍA

- Closa D, Sabater L, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, Roselló-Catafau J. *Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver.* Ann. Surg., 229:230-236 (1999).
- Closa D, Motoo Y, Iovanna J.L. *Pancreatitis-associated protein: From a lectin to an anti-inflammatory cytokine.* World J. Gastroenterol., 13: 170-174 (2007).
- Commins S, Steinke J.W, Borish L. *The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29.* J. Allergy Clin. Immunol., 121: 1108-11 (2008).
- Cui P, Yang Z, Zhang L, Sun Y. *Effects of sulfhydryl compounds on pancreatic cytoprotection in acute necrotic pancreatitis.* Chin. Med. J., 116: 57-61 (2007).
- Dabrowski A, Gabryelewicz A. *Oxidative stress. An early phenomenon characteristic of acute experimental pancreatitis.* Int. J. Pancreatol., 12:193-199 (1992).
- Dabrowski, A, Grady T, Logsdon C.D, Williams J.A. *Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo.* J. Biol. Chem., 271: 5686-5690 (1996).
- Dabrowski A, Boguslowicz C, Dabrowska M, Tribillo I, Gabryelewicz A. *Reactive oxygen species activate mitogenactivated protein kinases in pancreatic acinar cells.* Pancreas, 21: 376-384 (2000).
- Dabrowski A, Osada J, Dabrowska M.I, Wereszczynska-Siemiatkowska U. *Monocyte subsets and natural killer cells in acute pancreatitis.* Pancreatol., 8:126-34 (2008).
- Dalgat D.M, Magomaev M.Sh, Medzhidov R.T, Kurbanov K.M. *Diagnosis and treatment of acute pancreatitis.* Vestn. Khir. Im. I I Grek. 136: 29-33 (1986).
- Das A.K, Helps N.R, Cohen P.T, Barford D. *Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution.* EMBO J., 15: 6798-67809 (1996).
- De Campos T, Deree J, Coimbra R. *From acute pancreatitis to end-organ injury: mechanisms of acute lung injury.* Surg. Infect., 8:107-120 (2007).

BIBLIOGRAFÍA

- De Campos T, Deree J, Martins J.O, Loomis W.H, Shenvi E, Putnam J.G, Coimbra R. *Pentoxifylline attenuates pulmonary inflammation and neutrophil activation in experimental acute pancreatitis*. *Pancreas*. 37: 42-49 (2008).
- De Dios I, Ramudo L, García-Montero A.C, Manso M.A. *Redox-sensitive modulation of CD45 expression in pancreatic acinar cells during acute pancreatitis*. *J. Pathol.*, 210: 234-239 (2006).
- De Luca A, De Falco M, Severino A, Campioni M, Santini D, Baldi F, Paggi M.G. Baldi A. *Distribution of the serine protease HTRA1 in normal human tissues*. *The J. of histochem. and cytochem.*, 51: 1279-1284 (2003).
- Deleault K.M, Skinner S.J, Brooks S.A. *Tristetraprolin regulates TNF-alpha mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways*. *Mol. Immunol.*, 45: 13-24 (2008).
- Denham W.J, Yang G, Fink D, Denham G, Carter K, Ward K, Norman J. *Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis*. *Gastroenterology*, 113: 1741-1746 (1997).
- De Nigris F, Lerman L.O, Condorelli M, Lerman A, Napoli C. *Oxidation-Sensitive Transcription Factors and Molecular in the Arterial Wall*. *Antioxidants & Redox Signalling*, 3: 1119-1130 (2001).
- Deree J, Martins JO, Melbostad H, Loomis WH, Coimbra R. *Insights into the regulation of TNF-alpha production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition*. *Clinics*, 63: 321-328 (2008).
- Díaz D, Krejsa C.M, Kavanagh T.J. *Expression of glutamate-cysteine ligase during mouse development*. *Mol. Reprod. Dev.*, 62: 83-91 (2002).
- Dinarello C.A, Gelfand J.A, Wolff S.M. *Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome*. *JAMA*, 269: 1829-1835 (1993).
- Dreher D, Junod A.F. *Role of oxygen free radicals in cancer development*. *Eur. J. Cancer*, 32A: 30-38 (1996).
- Duan R.D, Williams J.A. *Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini*. *Am. J. Physiol.*, 267: 401-408 (1994).

BIBLIOGRAFÍA

- Dubois M.J, Bergeron S, Kim H.J, Dombrowski L, Perreault M, Fournès B, Faure R, Olivier M, Beauchemin N, Shulman G.I, Siminovitch K.A, Kim J.K, Marette A. *The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis*. Nat Med., 12:549-556 (2006).
- Duprez D.A. *Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review*. J. Hypertens., 24: 983-991 (2006).
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. *Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis*. Cancer Res., 57: 1835-1840 (1997).
- Endres S, Fülle H.J, Sinha B, Stoll D, Dinarello C.A, Gerzer R, Weber P.C. *Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear cells*. Immunology, 72: 56-60 (1991).
- Eşrefoğlu M, Gül M, Turan F. *Comparative effects of several therapeutic agents on hepatic damage induced by acute experimental pancreatitis*. Dig. Dis. Sci., 53: 1303-1310 (2008).
- Estrela J.M, Ortega A, Obrador E. *Glutathione in cancer biology and therapy*. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 43: 143-181 (2006).
- Evans JD, Cornford PA, Dodson A, Greenhalf W, Foster CS, Neoptolemos JP. *Detailed tissue expression of bcl-2, bax, bak and bcl-x in the normal human pancreas and in chronic pancreatitis, ampullary and pancreatic ductal adenocarcinomas*. Pancreatology. 1: 254-262 (2001).
- Ewenstein B.M, Freed J.H, Molet L, Nathenson S.G. *Localization of the papain cleavage site of H-2 glycoproteins*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 73: 915-918 (1976).
- Feschenko M, Stevenson E, Nairn A.C, Sweadner K.J. *A Novel cAMP-Stimulated Pathway in Protein Phosphatase 2A Activation*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 302: 111-118 (2002).
- Folch-Puy E, Granell S, Dagorn J.C, Iovanna J.L, Closa D. *Pancreatitis-associated protein I suppresses NF-kappa B activation through a JAK/STAT-mediated mechanism in epithelial cells*. J. Immunol., 176: 3774-3779 (2006).
- Foley T.D, Petro L.A, Stredny C.M, Coppa T.M. *Oxidative inhibition of protein phosphatase 2A activity: role of catalytic subunit disulfides*. Neurochem. Res., 32: 1957-1964 (2007).

BIBLIOGRAFÍA

- Folk J.E, Gladner J.A. *Carboxypeptidase B. III. Specific esterase activity*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 33: 570-572 (1959).
- Folk J. E. *Carboxypeptidase B. The Enzymes*: 57-79, Boyer P.D. (ed.), Academic Press, New York (1971).
- Formela L.J, Wood L.M, Whittaker M, Kingsnorth A.N. *Amelioration of experimental acute pancreatitis with a potent platelet-activating factor antagonist*. *Br. J. Surg.*, 81: 1783-1785 (1994).
- Frampton J.E, Brogden R.N. *Pentoxifylline (oxpentifylline). A review of its therapeutic efficacy in the management of peripheral vascular and cerebrovascular disorders*. *Drugs Aging*, 7:480-503 (1995).
- Frangioni J.V, Beahm P.H, Shifrin V, Jost C.A, Neel B.G. *The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence*. *Cell*, 68: 545-560 /1992).
- Fendrich V, Esni F, Garay M.V, Feldmann G, Habbe N, Jensen J.N, Dor Y, Stoffers D, Jensen J, Leach S.D, Maitra A. *Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas*. *Gastroenterology*, 135: 621-631 (2008).
- Fleischer T.C, Yun U.J, Ayer D.E. *Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex*. *Mol. Cell Biol.*, 23: 3456-3467 (2003).
- Fricker L.D. *Metallo-carboxypeptidase D. Handbook of Proteolytic Enzymes*: 1349-1351, Barrett A. J., Rawlings N. D. and Woessner J. F. (eds), Academic Press, London (1998).
- Friedl H.P, Till G.O, Ryan U.S, Ward P.A. *Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells*. *FASEB J.*, 3: 2512-2518 (1989).
- Fritsche E, Humm A, Huber R. *Substrate binding and catalysis by L-arginine:glycine amidinotransferase--a mutagenesis and crystallographic study*. *Eur. J. Biochem.*, 247: 483-490 (1997).
- Fujii K. *Unresolved rearrangement of thiazoline form of glutathione*. *Eur. J. Biochem.* 203: 75-80 (1992).

BIBLIOGRAFÍA

- Fujinaga M, Cherney M.M, Oyama H, Oda K, James M.N. *The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from Scytalidium lignicolum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 101: 3364-3369 (2004).
- García M, Platet N, Liaudet E, Laurent V, Derocq D, Brouillet J.P, Rochefort H. *Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis*. Stem. Cell, 14: 642-650 (1996).
- Gardell S.J, Craik C.S, Clauser E, Goldsmith E.J, Steward C.B, Graf M, Rutter W.J. *A novel rat carboxypeptidase, CPA2: characterization, molecular cloning and evolutionary implications on substrate specificity in the carboxypeptidase gene family*. J. Biol. Chem., 263, 17828-1736 (1988).
- Gironella M, Iovanna J.L, Sans M, Gil F, Penalva M, Closa D, Miquel R, Pique J.M, Panes J. *Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease*. Gut, 54: 1244-1253 (2005).
- Glitz D, Dekker C. *Studies on a Ribonuclease from Ustilago sphaerogena I. Purification and Properties of the Enzyme*. Biochemistry, 3:1391-1399 (1964).
- Gloor B, Uhl W, Tcholakov O, Roggo A, Muller C.A, Worni M, Büchler M.W. *Hydrocortisone treatment of early SIRS in acute experimental pancreatitis*. Dig. Dis. Sci., 46: 2154-2161 (2001).
- Gomez G, Lee H.M, He Q, Englander E.W, Uchida T, Greeley G.H Jr. *Acute pancreatitis signals activation of apoptosis-associated and survival genes in mice*. Exp. Biol. Med., 226: 692-700 (2001).
- Gómez-Cambronero L, Camps B, de La Asunción J.G, Cerdá M, Pellín A, Pallardó F.V, Calvete J, Sweiry J.H, Mann G.E, Viña J, Sastre J. *Pentoxifylline ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 293: 670-676 (2000).
- Gonzalez-Noriega A, Grubb J.H, Talkad V, and Sly W.S. *Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling*. J. Cell Biol., 85: 839-852 (1980).
- Gonze D, Goldbeter A. *A model for a network of phosphorylation-dephosphorylation cycles displaying the dynamics of dominoes and clocks*. J Theor. Biol., 210: 167-186. Erratum in: J. Theor. Biol., 212: 565 (2008).

BIBLIOGRAFÍA

- Gosselin D, Rivest S. *Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system.* Brain Behav. Immun. 21:281-289 (2007).
- Grady T, Dabrowski A, Williams J.A, Logsdon C.D. *Stress-activated protein kinase activation is the earliest direct correlate to the induction of secretagogue-induced pancreatitis in rats.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 227: 1-7 (1996).
- Granell S, Pereda J, Gómez-Cambronero L, Cassinello N, Sabater L, Closa D, Sastre J. *Circulating TNF-alpha and its soluble receptors during experimental acute pancreatitis.* Cytokine, 25: 187-191 (2004).
- Graef I.A, Stanhill A, Tell O, Engelberg D. *HSF and Msn2/4p can exclusively or cooperatively activate the yeast HSP104 gene.* Mol. Microbiol., 44: 21-35 (2002).
- Grigorevskiĭ V.P, Korotkina R.N, Karelin A.A. *Effects of several regulatory peptides on the functional activity of the pancreas in acute experimental pancreatitis.* Biull. Eksp. Biol. Med., 108: 428-430 (1989).
- Go YM, Jones DP. *Redox compartmentalization in eukaryotic cells.* Biochim. Biophys. Acta., 1780: 1273-1290 (2008).
- Gukovskaya A.S, Gukovsky I, Jung Y, Mouria M and. Pandol S.J. *Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. Roles in cell injury processes of pancreatitis.* J. Biol. Chem., 277: 22595-22604 (2002).
- Gukovskaya AS, Pandol SJ. *Cell death pathways in pancreatitis and pancreatic cancer.* Pancreatology, 4: 5675-86 (2004).
- Gukovsky I, Gukovskaya A.S, Blinman T.A, Zaninovic V., Pandol S.J. *Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis.* Am. J. Physiol., 275: 1402-1414 (1998).
- Gül M, Eşrefoğlu M, Öztürk F, Ateş B, Otlu A. *The Beneficial Effects of Pentoxifylline on Caerulein-Induced Acute Pancreatitis in Rats.* Dig. Dis. Sci., (2008). [Epub ahead of print].
- Gullberg D. *Re-programmable tumour cells: cytokines from the immune system assume new roles with the help of stem cells.* Scand. J. Immunol., 67: 632-633 (2008).

BIBLIOGRAFÍA

- Haigis M.C, Raines R.T. *Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway.* J. Cell Sci., 116: 313-324 (2003).
- Halangk W, Lerch M.M, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C and Deussing J. *Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis.* J. Clin. Invest., 106: 773-781 (2000).
- Halangk W, Kruger B, Ruthenburger M, Sturzebecher J, Albrecht E, Lippert H and Lerch M.M. *Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation.* Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 282: 367-374 (2002).
- Han Y, Haines C.J, Feng H.L. *Role(s) of the serine/threonine protein phosphatase 1 on mammalian sperm motility.* Arch. Androl., 53: 169-177 (2007).
- Haque K, Mohan P. *Pentoxifylline for neonatal sepsis.* Cochrane Database Syst. Rev.: CD004205 (2003).
- Harper E. *Collagenases.* Annu. Rev. Biochem., 49: 1063-1078 (1980).
- Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamoto A, Suyama K, Ida S, Okumura Y, Takahashi E, Kido H, Araki K, Baba H, Mizushima N, Yamamura K. *Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells.* J. Cell Biol., 181: 1065-1072 (2008).
- Hayes J.D, Pulford D.J. *The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.* Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 30: 445-600 (1995).
- Hervé C, de Franco P.O, Groisillier A, Tonon T, Boyen C. *New members of the glutathione transferase family discovered in red and brown algae.* Biochem. J., 412: 535-544 (2008).
- Hirata M. *Study of impaired metabolism of guanidinoacetic acid in uremia. The compensatory role of the pancreas in guanidinoacetic acid synthesis.* Nippon Jinzo Gakkai Shi., 31: 951-961 (1989).
- Hirata N, Yanagawa Y, Ebihara T, Seya T, Uematsu S, Akira S, Hayashi F, Iwabuchi K, Onoé K. *Selective synergy in anti-inflammatory cytokine production*

BIBLIOGRAFÍA

upon cooperated signaling via TLR4 and TLR2 in murine conventional dendritic cells. Mol. Immunol., 45: 2734-27342 (2008).

- Hitchler M.J, Domann F.E. *An epigenetic perspective on the free radical theory of development. Free Radic Biol Med.*, 43:1023-1036 (2007).
- Ho Y, Logue E, Callaway C.W, DeFranco D.B. *Different mechanisms account for extracellular-signal regulated kinase activation in distinct brain regions following global ischemia and reperfusion. Neuroscience*, 145: 248-255 (2007).
- Höfken T, Keller N, Fleischer F, Göke B, Wagner A.C. *Map kinase phosphatases (MKP's) are early responsive genes during induction of cerulein hyperstimulation pancreatitis. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276: 680-685 (2000).
- Hollinger, Ramineni S, Hepler J.R. *Phosphorylation of RGS14 by protein kinase A potentiates its activity toward Gai. Biochemistry*, 42: 811-819 (2003).
- Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lönn M.E, Hudemann C, Lillig C.H. *Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. Biochem. Soc. Trans.*, 33: 1375-1377 (2005).
- Hong K, Lou L, Gupta S, Ribeiro-Neto F, Altschuler D.L. *A novel Epac-Rap-PP2A signaling module controls cAMP-dependent Akt regulation. J. Biol. Chem.*, 283: 23129-23138 (2008).
- Huang H, Reed C.P, Zhang J.S, Shridhar V, Wang L y Smith D.I. *Carboxypeptidase A3 (CPA3): a novel gene highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of prostate epithelial cancer cells. Cancer Res.*, 59: 2981-2988 (1999).
- Huang Z, Somanath P.R, Chakrabarti R, Eddy E.M, S Vijayaraghavan. *Changes in Intracellular Distribution and Activity of Protein Phosphatase PP1g2 and Its Regulating Proteins in Spermatozoa Lacking AKAP41. Biol. of Reprod.*, 72: 384-392 (2005).
- Hunter T. *Protein-tyrosine phosphatases: the other side of the coin. Cell*, 58:1013-1016 (1989).
- Hunter T. *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. Cell*, 80: 225-236 (1995).

BIBLIOGRAFÍA

- Hussain S.P, Hofseth L.J, Harris C.C. *Radical causes of cancer*. Nat Rev Cancer, 3: 276-285 (2003).
- Hwang C, Sinskey A.J, Lodish H.F. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. Science, 257: 1496-1502 (1992).
- Ikeda A, Nishina P.M, Naggert J.K. *The tubby-like proteins, a family with roles in neuronal development and function*. J Cell Sci 115: 9-14 (2002).
- Ikeda Y, Miura T, Sakamoto J, Miki T, Tanno M, Kobayashi H, Ohori K, Takahashi A, Shimamoto K. *Activation of ERK and suppression of calcineurin are interacting mechanisms of cardioprotection afforded by delta-opioid receptor activation*. Basic Res. Cardiol., 101: 418-426 (2006).
- Imig J.D, Dimitropoulou C, Reddy D.S, White R.E. Falck JR. *Afferent arteriolar dilation to 11, 12-EET analogs involves PP2A activity and Ca²⁺-activated K⁺ Channels*. Microcirculation, 15:137-150 (2008).
- Iovanna J, Orelle B, Keim V, Dagorn J.C. *Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis*. J. Biol. Chem., 266: 24664-24669 (1991).
- Iyer R.A, Baggs R.B, Anders M.W. *Nephrotoxicity of the glutathione and cysteine S-conjugates of the sevoflurane degradation product 2-(fluoromethoxy)-1,1,3,3, 3-pentafluoro-1-propene (Compound A) in male Fischer 344 rats*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 283:1544-1551 (1997).
- Jacobus W.E, Lehninger A.L. *Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport*. J. Biol. Chem., 248: 4803-4810 (1973).
- Jarvis L.A, Toering S.J, Simon M.A, Krasnow M.A, Smith-Bolton R.K. *Sprouty proteins are in vivo targets of Corkscrew/SHP-2 tyrosine phosphatases*. Development, 133: 1133-1142 (2006).
- Just W.W, Leon-V J.O, Werner G. *Protective effect of polyanions on the constituents of rat liver lysosomal fraction in acidic pH*. Histochemistry, 41: 161-166 (1974).
- Kageyama T. *Molecular cloning, expression and characterization of an Ascaris inhibitor for pepsin and cathepsin E*. Eur. J. Biochem., 253: 804-809 (1998).

BIBLIOGRAFÍA

- Kamphuis I.G, Kalk K.H, Swarte M.B.A., Drenth J. *Structure of papain refined at 1.65 Å resolution.* J. Mol. Biol., 179, 233-256 (1984).
- Katoh T, Yamano Y, Tsuji M, Watanabe M. *Genetic polymorphisms of human cytosol glutathione S-transferases and prostate cancer.* Pharmacogenomics, 9: 93-104 (2008).
- Kean K.M, Howell M.T, Grunert S, Girard M, Jackson R.J. *Substitution mutations at the putative catalytic triad of the poliovirus 3C protease have differential effects on cleavage at different sites.* Virology, 194: 360-364 (1993).
- Keim V, Rohr G, Stockert H.G, Haberich F.J. *An additional secretory protein in the rat pancreas.* Digestion, 29: 242-249 (1984).
- Keyszer G.M, Heer A.H, Kriegsmann J, Geiler T, Trabandt A, Keysser M, Gay R.E, Gay S. *Comparative analysis of cathepsin L, cathepsin D and collagenase messenger RNA expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis by in situ hybridization.* Arthritis Rheum., 38: 976-984 (1995).
- Kim S, Paik W.K. *Effect of glutathione on ribonuclease.* Biochem. J., 106: 707-710 (1968).
- Kini R.M. *Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms.* Pathophysiol. Haemost. Thromb., 34: 200-204 (2005).
- Kirsche H, Barrett A.J. *The chemistry of lysosomal proteases.* In: *Lysosomes : their role in protein breakdown.* Glaunann H. and Ballard F.J. (eds), Academic press, New York, 193-238 (1987).
- Klee C.B, Ren H, Wang X. *Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin.* J. Biol. Chem. , 273:13367-13370 (1998).
- Knickelbein R G, Seres T, Lam G, Johnston R.B. Jr, Warshaw J.B. *Characterization of multiple cysteine and cystine transporters in rat alveolar type II cells.* Am. J. Physiol., 273: 1147-1155 (1997).
- Kobe B, Deisenhofer J. *Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats.* Nature, 366: 751-756 (1991).
- Koike H, Steer M.L and Meldolesi J. *Pancreatic effects of ethionine: blockade of exocytosis and appearance of crinophagy and autophagy precede cellular necrosis,* Am. J. Physiol., 242: 297-307 (1982).

BIBLIOGRAFÍA

- Koren S, Fantus I.G. *Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus*. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 21:621-640 (2007).
- Kyriakis J.M. Signalling by the germinal center kinase family of protein kinases. J. Biol. Chem., 274: 5259- 5262 (1999).
- Krebs E.G, Fischer E.H. *The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle*. Biochim. Biophys. Acta., 20: 150-157 (1956).
- Kuby, J. *Cytokines. Immunology*. J. Kuby. New York, WH Freeman and Co: 297-322 (1994).
- Kyriakis J.M, Avruch J. *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev 81: 807-869 (2001).
- Larvin M, McMahon M.J. *APACHE-II score for assessment and monitoring of acute pancreatitis*. Lancet 2: 201-205 (1989).
- Lawrence M.C, Jivan A, Shao C, Duan L, Goad D, Zaganjor E, Osborne J, McGlynn K, Stippec S, Earnest S, Chen W, Cobb M.H. *The roles of MAPKs in disease*. Cell Res. 18: 436-442 (2008).
- Lawson J.E, Niu X.D, Browning K.S, Trong H.L, Yan J, Reed L.J. *Molecular cloning and expression of the catalytic subunit of bovine pyruvate dehydrogenase phosphatase and sequence similarity with protein phosphatase 2C*. Biochemistry, 32: 8987-8993 (1993).
- Lawson M.A, Maxfield F.R. *Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils*. Nature, 377: 75-79 (1995).
- Lee M.G, Xu X, Zeng W, Diaz J, Wojcikiewicz R.J, Kuo T.H, Wuytack F, Racymaekers L, Muallem S. *Polarized expression of Ca²⁺ channels in pancreatic and salivary gland cells. Correlation with initiation and propagation of [Ca²⁺]_i waves*. J. Biol. Chem., 272: 15765-15770 (1997).
- Lefeuvre M, Bourd K, Loriot M.A, Goldberg M, Beaune P, Périanin A, Stanislawski L. *TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts*. J. Dent. Res., 83: 914-919 (2004).

BIBLIOGRAFÍA

- Lenz H, Schmidt M, Welge V, Kueper T, Schlattner U, Wallimann T, Elsässer H.P, Wittern K.P, Wenck H, Staeb F, Blatt T. *Inhibition of cytosolic and mitochondrial creatine kinase by siRNA in HaCaT- and HeLaS3-cells affects cell viability and mitochondrial morphology.* Mol. Cell Biochem., 306:153-162 (2007).
- Leung P.S, Chan Y.C. *Role of Oxidative Stress in Pancreatic Inflammation.* Antioxid. Redox Signal., 11: 135-165 (2009).
- Limb G.A, Matter K, Murphy G, Cambrey A.D, Bishop P.N, Morris G.E, Khaw P.T. *Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis.* Am. J. Pathol., 166: 1555-1563 (2005).
- Lin Y, Welsh W.J. *Molecular modeling of substrate-enzyme reactions for the cysteine protease papain.* J. Mol. Graph., 14: 62-72, 92-93 (1996).
- Lin E, Calvano S.E, Lowry S.F. *Inflammatory cytokines and cell response in surgery.* Surgery, 127: 117-26 (2000).
- Lires-Deán M, Caramés B, Cillero-Pastor B, Galdo F, López-Armada M.J, Blanco F.J. *Anti-apoptotic effect of transforming growth factor-beta1 on human articular chondrocytes: role of protein phosphatase 2A.* Osteoarthritis Cartilage, 16:1370-8 (2008).
- Lo HW, Ali-Osman F. *Genetic polymorphism and function of glutathione-S-transferases in tumor drug resistance.* Curr. Opin. Pharmacol., 7: 367-374 (2007).
- López-Otín C, Bond J.S. *Proteases: multifunctional enzymes in life and disease.* J. Biol. Chem., 283: 30433-30437 (2008).
- Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall J. *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J. Biol. Chem., 193: 265-275 (1951).
- Lundström-Ljung J, Holmgren A. *Glutaredoxin accelerates glutathione-dependent folding of reduced ribonuclease A together with protein disulfide-isomerase.* J. Biol. Chem., 270: 7822-7828 (1995).
- Lupal'tsev VI. *Use of a combination of rheopolyglucin, complamin and trental in the complex treatment of acute postoperative pancreatitis.* Klin. Khir., 11:27-29 (1988).

BIBLIOGRAFÍA

- Luthen R, Niederau C, Niederau M, Ferrell L.D and Grendell J.S. *Influence of ductal pressure and infusates on activity and subcellular distribution of lysosomal enzymes in the rat pancreas*, *Gastroenterology*, 109: 573-581 (1995).
- Malka D, Vasseur S, Bodeker H, Ortiz E.M, Dusetti N.J, Verrando P, Dagorn J.C, Iovanna J.L. *Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein I activation*. *Gastroenterology*, 119: 816-828 (2000).
- Malleo G, Mazzon E, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. *Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence*. *Shock*, 28:130-140 (2007).
- Mansuy I.M, Woolf T.B, Rao R. *Manganese selectivity of pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue gln 783 in transmembrane segment 6. Residue Asp 778 is essential for cation transport*. *J. Biol. Chem.*, 275: 23933-23938 (2000).
- Marshall C.J. *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation*. *Cell*, 80: 179-185 (1995).
- McCutcheon A and Race D. *Experimental pancreatitis: a possible etiology of post-operative pancreatitis*, *Ann. Surg.*, 155: 523-531 (1962).
- McElligott M.A, Miao P, Dice J.F. *Lysosomal degradation of ribonuclease A and ribonuclease S-protein microinjected into the cytosol of human fibroblasts*. *J. Biol. Chem.*, 260: 11986-11993 (1985).
- McGuire D.M, Gross M.D, Elde R.P, Van Pilsum J.F. *Localization of L-arginine-glycine amidinotransferase protein in rat tissues by immunofluorescence microscopy*. *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 429-435 (1986).
- Medzhitov R. *Origin and physiological roles of inflammation*. *Nature*, 454: 428-435 (2008).
- Meister A, Anderson M.E. *Glutathione*. *Annu. Rev. Biochem.*, 52: 711-760 (1983).
- Minden A, Lin A, Claret F.X, Abo A, Karin M. *Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs*. *Cell*, 81: 1147-1157.

BIBLIOGRAFÍA

- Misra-Press A, Rim C.S, Yao H, Roberson M.S, Stork P.J. *A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase. Structure, expression, and regulation.* J. Biol. Chem., 270:14587-15 (1995).
- Mizuochi T, Yee S.T, Kasai M, Kakiuchi T, Muno D, Kominami E. *Both cathepsin B and cathepsin D are necessary for processing of ovalbumin as well as for degradation of class II MHC invariant chain.* Immunol. Lett., 43: 189-193 (1994).
- Molketin J.D, Lu J.R, Antos C.L, Merkhham B., Richardson J, Robbins J, Grant S.R, Olson E.N. *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy.* Cell, 93: 215-228 (1998).
- Montero-Julian F.A. *The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function.* Cell Mol. Biol., 47: 583-597 (2001).
- Monti D.M, Montesano Gesualdi N, Matousek J, Esposito F, D'Alessio G. *The cytosolic ribonuclease inhibitor contributes to intracellular redox homeostasis.* FEBS Lett., 581: 930-934 (2007).
- Mordmuller B, Fendel R, Kreidenweiss A, Gille C, Hurwitz R, Metzger W.G, Kun J.F, Lamkemeyer T, Nordheim A, Kremsner P.G. *Plasmodia express two threonine peptidase complexes during asexual development.* Mol. Biochem. Parasitol., 148: 79-85 (2006).
- Mori A, Kohno M, Masumizu T, Noda Y, Packer L. *Guanidino compounds generate reactive oxygen species.* Biochem. Mol. Biol. Int., 40: 135-143 (1996).
- Mosman T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival.* J. Immunol. Methods, 65: 55-63 (1983).
- Mühl H, Pfeilschifter J. *Endothelial nitric oxide synthase: a determinant of TNF α production by human monocytes/macrophages.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 310: 677-680 (2003).
- Multigner L, Sarles H, Lombardo D, De Caro A. *Pancreatic stone protein. II. Implication in stone formation during the course of chronic calcifying pancreatitis.* Gastroenterology 89: 387-391 (1985).
- Muroi Y, Ishii T, Teramoto K, Hori M, Nishimura M. *Calcineurin contributes to the enhancing effect of adenosine on nerve growth factor-induced neurite outgrowth via the decreased duration of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation.* J. Pharmacol. Sci., 95: 124-131 (2004).

BIBLIOGRAFÍA

- Nakajima T, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzeki M, Sawa H, Kuroda Y. *Protective effects of vascular endothelial growth factor on intestinal epithelial apoptosis and bacterial translocation in experimental severe acute pancreatitis*. *Pancreas*, 34: 410-416 (2007).
- Namkung W, Yoon J.S, Kim K.H, Lee M.G. *PAR2 Exerts Local Protection against Acute Pancreatitis via Modulation of MAP Kinase and MAP Kinase Phosphatase Signaling*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 295: 886-894 (2008).
- Naskalski J.W, Kusnierz-Cabala B, Kedra B, Dumnicka P, Panek J, Maziarz B. *Correlation of peripheral blood monocyte and neutrophil direct counts with plasma inflammatory cytokines and TNF-alpha soluble receptors in the initial phase of acute pancreatitis*. *Adv. Med. Sci.*, 52: 129-134 (2007).
- Natarajan M, Lin K.M, Hsueh R.C, Sternweis P.C, Ranganathan R. *A global analysis of cross-talk in a mammalian cellular signalling network*. *Nature Cell Biology*, 8: 571-580 (2006).
- Nathan C. *Points of control in inflammation*. *Nature*, 420:846-852 (2002).
- Neye H, Verspohl E.J. *The FK506 binding protein 13 KDa (FKBP13) interacts with the C-chain of complement C1q*. *B.M.C. Pharmacol.*, 4:19 (2004).
- Noguchi T, Metz R, Chen L, Mattéi MG, Carrasco D, Bravo R. *Structure, mapping, and expression of erp, a growth factor-inducible gene encoding a nontransmembrane protein tyrosine phosphatase, and effect of ERP on cell growth*. *Mol. Cell Biol.*, 13: 5195- 5205 (1993).
- Norman J.G, Fink G.W, Messina J, Carter G, Franz M.G. *Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis*. *Surgery*, 120: 515-521 (1996).
- Norman J.G. *The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis*. *Am. J. Surg.*, 175: 76-83 (1998).
- O'Connor J.C, McCusker R.H, Strle K, Johnson R.W, Dantzer R, Kelley K.W. *Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: at the interface of immunology and endocrinology*. *Cell Immunol.*, 252: 91-110 (2008).
- Oliver C.J, Shenolikar S. *Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors*. *Front. Biosci.*, 3: 961-972 (1998).

BIBLIOGRAFÍA

- Olson J.M, Hallahan A.R. *p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy*. Trends Mol. Med., 10: 125-129 (2004).
- Ono K, Han J. *The p38 signal transduction pathway: activation and function*. Cell Signal 12: 1-13 (2000).
- Opie, E. *The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis*, Bull Johns Hopkins Hosp, 12: 182-192 (1901).
- Ortiz E.M, Dusetti N.J, Vasseur S, Malka D, Bodeker H, Dagorn J.C, Iovanna J.L. *The pancreatitis-associated protein is induced by free radicals in AR4-2J cells and confers cell resistance to apoptosis*. Gastroenterology, 114: 808-816 (1998).
- Osman M.O, Kristensen J.U, Jacobsen N.O, Lausten S.B, Deleuran B, Deleuran M, Gesser B, Matsushima K, Larsen C.G, Jensen S.L. *A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotising pancreatitis in rabbits*. Gut, 43: 232-239 (1998).
- Osman M.O, El-Sefi T, Lausten S.B, Jacobsen N.O, Larsen C.G, Jensen S.L. *Sodium fusidate and the cytokine response in an experimental model of acute pancreatitis*. Br. J. Surg., 85: 1487-1492 (1998).
- Pajares M.A., Duran C, Corrales F, Pliego M.M, Mato J.M.. *Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione*. J. Biol. Chem., 267: 17598-17605 (1992).
- Pallen M, Wren B.W. *The HTRA family of serine proteases*. Mol. Microb., 26: 209-221 (1997).
- Pandol S.J, Saluja A.K, Imrie C.W, Banks P.A. *Acute pancreatitis: bench to the bedside*. Gastroenterology, 133: 1056.e1-1056.e25 (2007).
- Papachristou G.I. *Prediction of severe acute pancreatitis: Current knowledge and novel insights*. World J. Gastroenterol., 14: 6273-6275 (2008).
- Pardo A, Selman M. *Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodelling*. Proc. Am. Thorac. Soc., 3: 383-388 (2006).

BIBLIOGRAFÍA

- Pei D, Kang T, Qi H. *Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation.* J. Biol. Chem., 275: 33988-33997 (2000).
- Pereda J, Sabater L, Cassinello N, Gómez-Cambronero L, Closa D, Folch-Puy E, Aparisi L, Calvete J, Cerdá M, Lledó S, Viña J, Sastre J. *Effect of simultaneous inhibition of TNF-alpha production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases.* Ann. Surg. 240:108- 116 (2004).
- Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Viña J, López-Rodas G, Sastre J. *Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis.* Curr. Med. Chem., 13:2775-2787 (2006).
- Pereda J, Escobar J, Sandoval J, Rodríguez JL, Sabater L, Pallardó F.V, Torres L, Franco L, Viña J, López-Rodas G, Sastre J. *Glutamate cysteine ligase up-regulation fails in necrotizing pancreatitis.* Free Radic. Biol. Med., 44: 1599-15609 (2008).
- Pérez-Galán P, Roué G, López-Guerra M, Nguyen M, Villamor N, Montserrat E, Shore G.C, Campo E, Colomer D. *BCL-2 phosphorylation modulates sensitivity to the BH3 mimetic GX15-070 (Obatoclax) and reduces its synergistic interaction with bortezomib in chronic lymphocytic leukemia cells.* Leukemia, 22: 1712-1720 (2008).
- Pérez-Tamayo R. *Morphostasis: regulation of structure.* Bol. Estud. Med. Biol., 1: 145-161 (1974).
- Pham C.T. *Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation.* Nat. Rev. Immunol., 6: 541-550 (2006).
- Peppelenbosch M, Van Deventer S. *Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease.* Gastroenterology, 122: 7-14 (2002).
- Proskuryakov S.Y, Konoplyannikov A.G, Gabai V.L. *Necrosis: a specific form of programmed cell death?* Exp Cell Res., 283: 1-16 (2003).
- Puente X.S, Sánchez L.M, Overall C.M, López-Otín C. *Human and mouse Proteases: A comparative approach.* Nature Review Genetics, 4, 544-558 (2003).

BIBLIOGRAFÍA

- Rahman S.H, Ibrahim K, Larvin M, Kingsnorth A, McMahon M.J. *Association of antioxidant enzyme gene polymorphisms and glutathione status with severe acute pancreatitis*. *Gastroenterology*, 126: 1312-1322 (2004).
- Rajavashisth T.B, Xu X.P, Jovinge S, Meisel S, Xu X.O, Chai N.N, Fishbein M.C, Kaul S, Cercek B, Sharifi B, Shah P.K. *Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Expression in Human Atherosclerotic Plaques. Evidence for Activation by Proinflammatory Mediators*. *Circulation*, 99: 3103-3109 (1999).
- Ranson J.H, Rifkind K.M, Roses D.F, Fink S.D, Eng K, Spencer F.C. *Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis*. *Surg. Gynecol. Obstet.* 139: 69-81 (1974).
- Rao R.K, Clayton L.W. *Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293: 610-616 (2002).
- Rawlings N.D, Barret A.J. *Evolutionary families of peptidases*. *Biochem. J.*, 290, 205-218 (1993).
- Rawlings N.D, Barrett A.J. *Families of serine peptidases*. *Meth. Enzymol.*, 244: 19-61 (1994).
- Rawlings N.D, Barrett A.J. *Families of cysteine peptidases*. *Meth. Enzymol*, 244: 461-486 (1994).
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. *MEROPS: the peptidase database*. *Nucleic Acids Res.*, 36: 320-325 (2008).
- Ray R.M, Bhattacharya S, Johnson L.R. *EGFR plays a pivotal role in the regulation of polyamine-dependent apoptosis in intestinal epithelial cells*. *Cell Signal.*, 19: 2519-2527 (2007).
- Reed D.J, Babson J.R, Beatty P.W, Brodie A.E, Ellis W.W, Potter D.W. *High performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides*. *Anal Biochem.*, 106: 55-62 (1980).
- Regnér S, Manjer J, Appelros S, Hjalmarsson C, Sadic J, Borgström A. *Protease activation, pancreatic leakage, and inflammation in acute pancreatitis: differences*

BIBLIOGRAFÍA

between mild and severe cases and changes over the first three days. Pancreatology, 8:600-607 (2008).

- Reznik S.E, Fricker L.D. *Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding. Cell. Mol. Life Sci., 58: 1790-1804 (2001).*
- Richman P.G, Meister A. *Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. J. Biol. Chem., 250: 1422-1426 (1975).*
- Ridnour L.A, Thomas D.D, Mancardi D, Espey M.G, Miranda K.M, Paolocci N, Feelisch M, Fukuto J, Wink D.A. *The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. Biol. Chem., 385: 1-10 (2004).*
- Roberts N.B. *human pepsins - their multiplicity, function and role in reflux disease. Aliment. Pharmacol. Ther., 24: 2-9 (2006). Erratum in: Aliment. Pharmacol. Ther., 24: 1506 (2006).*
- Rodríguez J, Lazebnik Y. *Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme., Genes Dev., 13: 3179-3184 (1999).*
- Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, Köster A, Hess B, Evers M, Von Figura K. *Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. EMBO J., 14: 3599-3608 (1995).*
- Saluja A, Saluja M, Villa A, Leli U, Rutledge P, Meldolesi J and Steer M. *Pancreatic duct obstruction in rabbits causes digestive zymogen and lysosomal enzyme colocalization. J. Clin. Invest. 84: 1260-1266 (1989).*
- Samuel I, Tephly L, Williard D.E, Carter A.B. *Enteral exclusion increases MAP kinase activation and cytokine production in a model of gallstone pancreatitis. Pancreatology, 8: 6-14 (2008).*
- Sandoval J, Pereda J, Rodriguez J.L, Sastre J, López-Rodas G. *Regulación epigenética en la pancreatitis necrótica aguda. An. R. Acad. Nac. Farm., 73: 47-64 (2007).*

BIBLIOGRAFÍA

- San Segundo B, Martinez M.C, Vilanova M, Cuchillo C.M, Aviles F.X. *The severed activation segment of porcine pancreatic procarboxypeptidase A is a powerful inhibitor of the active enzyme.* Biochim. Biophys. Acta., 707: 74-80 (1982).
- Sanfey H, Bulkley G.B, Cameron J.L. *The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis.* Ann. Surg., 200: 405-413 (1984).
- Sanfey H, Sarr M.G, Bulkley G.B, Cameron J.L. *Oxygen-derived free radicals and acute pancreatitis: a review.* Acta Physiol. Scand. Suppl., 548: 109-118 (1986).
- Sans M.D, Xie Q, Williams J.A. *Regulation of translation elongation and phosphorylation of eEF2 in rat pancreatic acini.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 319: 144-151 (2004).
- Santiago A.P, Chaves E.A, Oliveira M.F, Galina A. *Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: Correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues.* Biochimie., 90: 1566-1577 (2008).
- Sarmiento N, Sánchez-Bernal C, Ayra M, Pérez N, Hernández-Hernández A, Calvo J.J, Sánchez-Yagüe J. *Changes in the expression and dynamics of SHP-1 and SHP-2 during cerulein-induced acute pancreatitis in rats.* Biochim. Biophys. Acta., 1782: 271-279 (2008).
- Sastradipura D.F, Nakanishi H, Tsukuba T, Nishishita K, Sakai H, Kato Y, Gotow T, Uchiyama Y, Yamamoto K. *Identification of cellular compartments involved in processing of cathepsin E in primary cultures of rat microglia.* J. Neurochem., 70: 2045-2056 (1998).
- Sawe N, Gary S, Zhao H. *Dual Roles of the MAPK/ERK 1/2 Cell Signaling Pathway after Stroke.* Journal of Neuroscience research, 86: 1659-1669 (2008).
- Schafer C, Ross S.E, Bragado M.J, Groblewski G.E, Ernst S.A, Williams J.A. *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: 24173-24180 (1998).
- Schandené L, Vandenbussche P, Crusiaux A, Alègre M.L, Abramowicz D, Dupont E, Content J, Goldman M. *Differential effects of pentoxifylline on the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) by monocyte and T cells.* Immunology, 76: 30-34 (1992).

BIBLIOGRAFÍA

- Scheraga HA, Konishi Y, Rothwarf D.M, Mui P.W. *Toward an understanding of the folding of ribonuclease A*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 84: 5740-5744 (1987).
- Schermuly R.T, Roehl A, Weissmann N, Ghofrani H.A, Leuchte H, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D. *Combination of nonspecific PDE inhibitors with inhaled prostacyclin in experimental pulmonary hypertension*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 281:1361-1368 (2001).
- Schnekenburger J, Mayerle J, Krüger B, Buchwalow I, Weiss F.U, Albrecht E, SamoiloVA V.E, Domschke W, Lerch M.M. *Protein tyrosine phosphatase kappa and SHP-1 are involved in the regulation of cell-cell contacts at adherens junctions in the exocrine pancreas*. Gut, 54: 1445-1455 (2005).
- Schulz H.U, Niederau C, Klonowski-Stumpe H, Halangk W, Luthen R, Lippert H. *Oxidative stress in acute pancreatitis*. Hepatogastroenterology. 46:2736-2750 (1999).
- Sekimoto M, Takada T, Kawarada Y, Hirata K, Mayumi T, Yoshida M, Hirota M, Kimura Y, Takeda K, Isaji S, Koizumi M, Otsuki M, Matsuno S. *JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, natural history, and outcome predictors in acute pancreatitis*. J. Hepatobiliary Pancreat. Surg., 13: 10-24 (2006).
- Shapiro R. *Cytoplasmic Ribonuclease inhibitor*. Methods Enzymol., 341:611-628 (2001).
- Shelton M.D, Mieyal J.J. *Regulation by Reversible S-Glutathionylation: Molecular Targets Implicated in Inflammatory Diseases*. Mol. Cells, Vol. 25; 332-346 (2008).
- Shi Y. *Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view*. Protein Sci., 13: 1979-1987 (2004).
- Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. *Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction*. Pancreatology, 5: 492-500 (2005).
- Shinzeki M, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Matsumura N, Sawa H, Nakajima T, Matsumoto I, Fujita T, Ajiki T, Fujino Y, Kuroda Y. *Prediction of early death in severe acute pancreatitis*. J. Gastroenterol., 43:152-158 (2008).
- Sies H. *Biochemistry of oxidative stress*. Angewandte Chem. 25: 1058-1071 (1986).

BIBLIOGRAFÍA

- Sies H. *Oxidative stress: from basic research to clinical application*. Am. J. Med., 91: 31-38 (1991).
- Simeone D.M, Zhang L, Graziano K, Nicke B, Pham T, Schaefer C, Logsdon C.D. *Smad4 mediates activation of mitogen-activated protein kinases by TGF-beta in pancreatic acinar cells*. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 281: 311-319 (2001).
- Solinas G, Vilcu C, Neels J.G, Bandyopadhyay G.K, Luo J.L, Naugler W, Grivennikov S, Wynshaw-Boris A, Scadeng M, Olefsky J.M, Karin M. *NK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity*. Cell Metab., 6: 386-397 (2007).
- Sorrentino S. *Human extracellular ribonuclease: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types*. Cell Mol. Life Sci., 54: 785-794 (1998).
- Spittel jr J.A. *Pentoxifylline and intermitent claudication*. Ann. Intern. Med., 102: 126-127 (1985).
- Steer M. *Pancreatitis severity: who calls the shots?* Gastroenterology, 122: 1168-1172 (2002).
- Szasz G.A. *Kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase*. Clin. Chem., 15: 124-36 (1969).
- Tabernero L, Aricescu A.R, Jones E.Y, Szedlacsek S.E. *Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships*. FEBS J., 275:867-882 (2008).
- Tachikawa M, Fukaya M, Terasaki T, Ohtsuki S, Watanabe M. *Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glia relationship for brain energy homeostasis*. European Journal of Neuroscience, 20: 144 -160 (2004).
-
- Tamura G, Nishizuka S, Maesawa C, Suzuki Y, Iwaya T, Sakata K, Endoh Y , Motoyama T. *Mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumours of Japanese patients*. Eur. J. Cancer, 35: 316-319 (1999).
- Tateishi N, Higashi T, Shinya S, Naruse A, Sakamoto Y. *Studies on the regulation of glutathione level in rat liver*. J. Biochem., 75: 93-103 (1974).

BIBLIOGRAFÍA

- Terradez P, Asensi M, Lasso de la Vega M.C, Puertes I.R, Viña J, Estrela J.M. *Depletion of tumour glutathione in vivo by buthionine sulfoximine: modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth.* Biochem. J., 292: 477-483 (1993).
- Tonks N.K. *Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 7: 833-846 (2006).
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilisa RD, Huang P. *Redox regulation of cell survival.* Antioxid Redox Signal, 10: 1343-74 (2008).
- Tripathi A, Sodhi A. *Involvement of JAK/STAT, PI3K, PKC and MAP kinases in the growth hormone induced production of cytokines in murine peritoneal macrophages in vitro.* Biosci. Rep., (2008). [(ahead of print)]
- Tsai K, Wang S.S, Chen T.S, Kong C.W, Chang F.Y, Lee S.D, Lu F.J. *Oxidative stress: an important phenomenon with pathogenetic significance in the progression of acute pancreatitis.* Gut, 42:850-855 (1998).
- Turjanski A-G, Vaque´ J.P, Gutkind J.S. *MAP kinases and the control of nuclear events.* Oncogene, 26: 3240-3253 (2007).
- Unlü A, Ates NA, Tamer L, Ates C. *Relation of glutathione S-transferase T1, M1 and P1 genotypes and breast cancer risk.* Cell Biochem. Funct. 26: 643-647 (2008).
- Van Acker G.J, Weiss E, Steer M.L, Perides G. *Cause-effect relationships between zymogen activation and other early events in secretagogue-induced acute pancreatitis.* Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 292: 1738-1746 (2007).
- Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P. *The mitochondrial serine protease HTRA2/Omi: an overview.* Cell Death Differ., 15: 453-460 (2008).
- Vinokurova L.V, Zhivaeva N.S, Tsaregorodtseva T.M, Serova T.I. *A cytokine status in chronic alcoholic and biliary pancreatitis.* Ter. Arkh., 78: 57-60 (2006).
- Viña JR, Palacin M, Puertes IR, Hernandez R, Viña J. *Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation.* Am. J. Physiol., 257: 916-922 (1989).

BIBLIOGRAFÍA

- Viterbo D, Bluth M.H, Mueller C.M, Zenilman M.E. *Mutational characterization of pancreatitis-associated protein 2 domains involved in mediating cytokine secretion in macrophages and the NF-kappaB pathway.* J. Immunol., 181: 1959-1968 (2008).
- Wada T, Penninger JM. *Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation.* Oncogene, 23: 2838-2849 (2004).
- Wagner A.C, Metzler W, Hofken T, Weber H, Goke B. *p38 map kinase is expressed in the pancreas and is immediately activated following cerulein hyperstimulation.* Digestion, 60: 41-47 (1999).
- Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Wagner W, Dastych J. *HIF-1alpha is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT.* J. Immunol., 181:1665-1672 (2008).
- Walker J.B. *Amidino transferase.* in the *Enzymes*, 3rd edn (Boyer, P.D., ed): 497-509 (1973).
- Walker J.B. *Creatine: biosynthesis, regulation, and function.* Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 50:177-242 (1979).
- Walton K.M, Dixon J.E. *Protein tyrosine phosphatases.* Annu. Rev. Biochem., 62: 101-120 (1993).
- Wang H.G, Pathan N, Ethell I.M, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke T.F, Reed J.C. *Ca²⁺ induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD.* Science, 284: 339-343 (1999).
- Wang J, Pan S, Berk B.C. *Glutaredoxin mediates Akt and eNOS activation by flow in a glutathione reductase-dependent manner.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 27: 1283-1288 (2007).
- Wang B, Zhang P, Wei Q. *Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases.* Sci. China C. Life Sci. 51:487-494 (2008).
- Watanabe, O, Baccino F.M, Steer M.L and Meldolesi J. *Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis.* Am. J. Physiol., 246: 457-467 (1984).

BIBLIOGRAFÍA

- Webster C.R, Blanch C, Anwer M.S. *Role of PP2B in cAMP-induced dephosphorylation and translocation of NTCP.* Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol., 283: 44-50 (2002).
- Wessely-Szponder J. *The influence of TNF α and IL-8 on secretory action of neutrophils isolated from heifers in the course of bovine respiratory disease.* Acta Vet Hung. 56: 187-196 (2008).
- Weston C.R, Davis R.J. *The JNK signal transduction pathway.* Curr. Opin. Genet. Dev., 12: 14-21 (2002).
- Weston C.R, Davis R.J. *The JNK signal transduction pathway.* Curr. Opin. Cell Biol., 19: 142-149 (2007).
- Widdison A.L, Karanjia N.D, Alvarez C, Reber H.A. *Influence of levamisole on pancreatic infection in acute pancreatitis.* Am. J. Surg., 163: 100-104 (1992).
- Williams J.A, Sans M.D, Tashiro M, Schafer C, Bragado M.J, Dabrowski A. *Cholecystokinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells.* Pharmacol. Toxicol., 91: 297-303 (2002).
- Whitbread A.K, Masoumi A, Tetlow N, Schmuck E, Coggan M, Board P.G. *Characterization of the omega class of glutathione transferases.* Methods Enzymol., 401: 78-99 (2005).
- Xing Y, Xu Y, Chen Y, Jeffrey P.D, Chao Y, Lin Z, Li Z, Strack S, Stock J.B, Shi Y. *Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins.* Cell, 127: 341-353 (2006).
- Xu F, Xu MJ, Zhao R, Guerrah A, Zeng F, Zhao ZJ. *Tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 are associated with distinct tyrosine-phosphorylated proteins.* Exp Cell Res., 272: 75-83 (2002).
- Xu Y, Krukoff TL. *Adrenomedullin stimulates nitric oxide production from primary rat hypothalamic neurons: roles of calcium and phosphatases.* Mol. Pharmacol., 72: 112-120 (2007).
- Yamauchi J, Shibuya K, Sunamura M, Arai K, Shimamura H, Motoi F, Takeda K, Matsuno S. *Cytokine modulation in acute pancreatitis.* J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 8: 195-203 (2001).

BIBLIOGRAFÍA

- Yan L, Lavin V.A, Moser L.R, Cui Q, Kanies C, Yang E. *PP2A regulates the pro-apoptotic activity of FOXO1*. J. Biol. Chem., 283: 7411-7420 (2008).
- Yang J, Murphy C, Denham W, Botchkina G, Tracey K.J, Norman J. *Evidence of a central role for p38 map kinase induction of tumor necrosis factor alpha in pancreatitis-associated pulmonary injury*. Surgery, 126: 216-222 (1999).
- Yokota S, Tsuji H, KATO K. *Immunocytochemical Localization of Cathepsin B in Rat Kidney. I. Light Microscopic Study Using the Indirect Immunoenzyme Technique*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 34: 891-897 (1986).
- Yoshimura A, Naka T, Kubo M. *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation*. Nature Review Immunology, 7: 454-465 (2007).
- Yu W.K, Li W.Q, Li N, Li J.S. *Mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression in the early phase of acute pancreatitis*. Pancreatology, 4: 233-243 (2004).
- Zabel P, Schade F.U, Schlaak M. *Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline*. Immunobiology. 187:447-463 (1993).
- Zamoyska R. *Why is there so much CD45 on T cells?* Immunity., 27: 421-423 (2007).
- Zaporozhchenko B.S, Shishlov VI. *Functional state of the liver in patients with an acute destructive pancreatitis in the early postoperative period*. Klin. Khir., 1: 29-31 (2005).
- Zhang J, Zhang L, Zhao S, Lee EY. *Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1*. Biochemistry, 37: 16728-16734 (1998).
- Zhang SQ, Yang W, Kontaridis MI, Bivona TG, Wen G, Araki T, Luo J, Thompson JA, Schraven BL, Philips MR, Neel BG. *Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment*. Mol Cell, 13: 341-355 (2004).
- Zhang J.X, Dang S.C, Qu J.G, Wang X.Q, Chen G.Z. *Changes of gastric and intestinal blood flow, serum phospholipase A2 and interleukin-1beta in rats with acute necrotizing pancreatitis*. World J Gastroenterol., 11: 3578-35781 (2005).

BIBLIOGRAFÍA

- Zhang X.P, Wang L, Zhou Y.F. *The pathogenic mechanism of severe acute pancreatitis complicated with renal injury: a review of current knowledge*, Dig. Dis. Sci., 52: 297-306 (2008).
- Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. *Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis*. Cell Death and Differentiation, 6: 644 -651 (1999).
- Zhou B, Wang Z.X, Zhao Y, Brautigan D.L, Zhang Z.Y. *The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases*. J. Biol. Chem., 277: 31818-31825 (2002).
- Zhuang S, Kinsey G.R, Yan Y, Han J, Schnellmann R.G. *Extracellular signal-regulated kinase activation mediates mitochondrial dysfunction and necrosis induced by hydrogen peroxide in renal proximal tubular cells*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 325: 732-740 (2008).
- Zurawa-Janicka D, Narkiewicz J, Lipinska B. *Characterization of the HTRA family of proteins*. Postepy. Biochem., 53: 27-36 (2007).