

VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA



Papel del estrés oxidativo y del tejido adiposo en la pancreatitis aguda experimental

Tesis Doctoral, presentada por:

Salvador Pérez Garrido

Dirigida por los profesores:

Dr. Juan Sastre Belloch

Dr. Javier Pereda Cervera

Valencia, Septiembre de 2013

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

D. Javier Pereda Cervera, Doctor en Farmacia y Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que D. **SALVADOR PÉREZ GARRIDO**, Licenciado en Farmacia, ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología de la Universitat de València la memoria titulada “**Papel del estrés oxidativo y del tejido adiposo en la pancreatitis aguda experimental**”, presentada para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia, a 13 de Septiembre de 2013.

Fdo. Juan Sastre Belloch

Fdo. Javier Pereda Cervera

A mis padres y hermana

A María José

A mi hijo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a mis directores de Tesis, los Profesores Juan Sastre y Javier Pereda:

A Juan, por haberme dado la oportunidad de desarrollar esta Tesis Doctoral, pero sobre todo, por abrirme las puertas del mundo científico, totalmente desconocido para mí hasta que me embarqué en esta aventura. No tengo suficientes palabras para poder expresar mi gratitud por haber confiado en mí y por haberme enseñado a vivir con pasión esta profesión tan fascinante. Gracias por todo, Juan.

A Javi, porque has sido el espejo en el que me he mirado todos estos años para ir mejorando día a día tanto en el plano profesional como personal. Espero haber estado a la altura de tu calidad como científico y persona, ha sido un orgullo trabajar contigo. Gracias por tu implicación desde el primer día, por tu apoyo y por tu paciencia. Siempre serás mi “hermano mayor” científico.

También quiero agradecer el apoyo y ayuda constante que he recibido siempre de mi grupo de investigación, destacando especialmente a Dolores Royo y a Ana Martínez. A Pain, por enseñarme prácticamente todo lo que sé de laboratorio, por ayudarme en esos primeros días siempre tan difíciles en un lugar nuevo y fundamentalmente, por haberme dejado ser amigo tuyo. Sólo puedo decir, gracias. Gracias también a Ana, has sido mi compañera de fatigas todos estos años, con eso está dicho todo. Los dos sabemos lo que hemos vivido juntos en esos pocos metros cuadrados que hay entre bancada y bancada. Ha sido un placer realizar la Tesis como compañero tuyo. Espero estar ahí el día que defiendas la tuya.

Como no, quiero agradecer al resto del laboratorio y Departamento de Fisiología la inmejorable acogida y el cariñoso trato que he recibido de todos vosotros. Me habéis hecho sentir como si fuera mi propia casa, sois mi segunda familia, y no creo que encuentre nunca unos compañeros tan excepcionales y cercanos. Todos, de una manera u otra, habéis contribuido a la realización de este trabajo y principalmente, a que hayan sido unos años inolvidables. Os merecéis el nombraros uno por uno (por orden alfabético para no levantar suspicacias), espero que no se me olvide nadie. Gracias a Antonio Alberola, todavía recuerdo tus clases de Fisiología en la Facultad, es un orgullo ser, hoy en día, compañero tuyo, jamás lo hubiera imaginado. Gracias a Miguel Asensi, por tu carácter, por tu particular sentido del humor, por estar siempre disponible, en pocas palabras, por ser como eres. Gracias a Salvador Banacloche, por estar siempre pendiente de lo que necesitaba. Gracias a Mari

Blanch, por tu simpatía y por tu ayuda en estos trámites finales. Gracias a Consuelo Burguete, por tu simpatía, por tu continuo interés día tras día. Gracias a Julián Carretero, mi “doctor seco”, por ser tan buen amigo, con eso está dicho todo. Gracias a María Castelló, por tu cercanía, amabilidad e interés. Gracias a José María Centeno, por ser tan buen tipo, en dos palabras. Gracias a José María Estrela, porque siempre te has preocupado de preguntarme cómo estaba, no lo olvidaré. Gracias a Vannina González, por tu sincero interés desde que llegué aquí. Gracias a Antonio Iradi, por la confianza que has depositado en mí en el departamento, que ha sido mucha. Gracias a Tere Jover, por tu simpatía, tu buen humor y tu trato cercano. Gracias a Pilar Laso, por tenerlo siempre todo a punto, pero sobre todo, por ser tan entrañable y dar un toque tan familiar y humano al departamento, eso no tiene precio. Gracias a Salva Mena, mi tocayo, te echo mucho de menos por aquí. Gracias a Javier Miranda, tú sabes muy bien lo que has representado para mí, no podría explicarlo con palabras, no cambies nunca. Gracias a Inma Noguera, por tu eficiencia y disponibilidad y por todo lo que me has enseñado sobre el manejo de animales. Gracias a Ángel Ortega, cómo he dicho con Julián, por ser algo tan sencillo y a la vez tan difícil, un amigo para siempre. Necesitaría un apartado de agradecimientos exclusivo para vosotros dos, os admiro profundamente en todos los aspectos, sois únicos. Gracias a Joan Salom, por traerme limones, no, es broma, por mostrar siempre un interés sincero en todo lo que he estado haciendo. Gracias a Raquel Taléns, por tu inestimable y desinteresada ayuda. Gracias a Germán Torregrosa, por la simpatía que siempre me has demostrado.

Mención especial en este apartado de agradecimientos para tres personas muy importantes en todos estos años, Isabel Torres, María Rodríguez e Inés Pulido. Cuánto hemos vivido juntos y de qué forma tan intensa. Siempre os llevaré en el corazoncito. Gracias por todo, chicas.

También quiero nombrar a toda la nueva generación que ha desembarcado en el laboratorio, gracias a Dan, Toni, Juanlu, Mariam, Mikahela, María Gamón y María Jorques por vuestro continuo interés. Estoy aquí para lo que necesitéis. Ánimo en vuestra carrera científica que acaba de comenzar.

Todos vosotros habéis hecho de este laboratorio un espacio extraordinario y único en el que ha sido muy agradable desarrollar este trabajo. Sólo puedo decir, GRACIAS!!!

Escribiendo estas líneas no puedo olvidarme de mis amigos de siempre, afortunadamente para mí sois muchísimos los que ocupáis ese lugar y todos sabéis lo que siempre he valorado la amistad, así que parte de esta Tesis

también os la debo. Gracias a mis amigos de Canet, se han cumplido treinta años desde que os conozco y ahí seguimos juntos. Gracias a mis amigos de la falla, cuantas historias y aventuras me vienen a la cabeza, la vida no sólo es estudiar. Gracias a mis amigos del pueblo, aunque nos veamos poco siempre os tengo presentes. Gracias a Nuria, por estar pendiente de mi hermana. Y sobre todo, gracias a mi compañero de andanzas durante prácticamente toda mi vida, mi buen amigo Pedro, que incluso participó de forma activa en la realización de algún experimento de los que se compone la Tesis. Gracias a todos y cada uno de vosotros.

También quiero tener unas palabras de recuerdo y agradecimiento a mi familia. Sois la parte más importante de mi vida, y espero que estéis orgullosos de mí cuando leáis estas líneas.

A mi familia política, Ángel, María, Ángela, Sandra, Pedro, porque siempre me habéis acogido con cariño en vuestra casa y sólo puedo tener palabras de agradecimiento hacia vosotros.

Gracias a mis primos, tías y tíos, Anna, Javier, María, Alicia, Pepa, Rami, Juanpe, Raúl. Somos muy poquitos, pero nos queremos mucho. Pocas familias pueden presumir de llevarse tan bien y de estar tan unidos como nosotros. Estoy orgulloso de ser uno de los vuestros.

A mis abuelos, María, Miguel y Tonica. Aunque ya no estéis aquí, me gustaría pensar que desde algún lugar seguís observando a vuestro nieto, os echo mucho de menos, en especial a mi abuelita, a la que tanto he querido y que nos dejó hace tres años, justo cuando iniciaba esta Tesis. Sé que siempre estás ahí ayudándome.

Gracias a Raquel, mi hermana. Siempre te has preocupado mucho por mí y sé que siempre podré contar contigo. Espero que pronto encuentres tu hueco en el mundo. Tu hermano siempre velará por tu felicidad, no tengas duda.

Gracias, sobre todo, a mis padres, Julia y Toni. Os debo todo lo que soy. Gracias por vuestro amor incondicional, por vuestro apoyo, por vuestra comprensión, por la educación que me habéis dado, por los valores que me habéis inculcado, en definitiva, gracias por todo. Es un orgullo ser hijo vuestro.

Y como no, gracias a María José. Podría estar horas y horas escribiendo todo lo que haces por mí. Has vivido esta Tesis como si fuera tuya, preguntándome día tras día que estaba haciendo, interesándote por todo lo que hacía, apoyándome y ayudándome en los momentos más duros. Formas parte de ella. Gracias por darme tu cariño y estar a mi lado todos estos años, pero sobre todo, gracias por ser la madre de mi hijo, Miguel Ángel.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ABREVIATURAS	XV
<i>I-INTRODUCCIÓN</i>	1
1. PANCREATITIS AGUDA	3
1.1. Definición.	3
1.2. Epidemiología y etiología.....	8
1.3. Patogenia.....	9
1.3.1. Activación intracelular de los zimógenos.....	10
1.3.2. Respuesta inflamatoria en la pancreatitis aguda.....	14
1.3.2.1. Citoquinas.....	14
1.3.2.1.1. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).....	15
1.3.2.1.2. Interleuquina 1 (IL-1).	16
1.3.2.1.3. Interleuquina 6 (IL-6).	17
1.3.2.1.4. Interleuquina 10 (IL-10).	18
1.4. Fisiopatología. Efectos sistémicos de la pancreatitis aguda.	18
1.4.1. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).	19
1.4.2. Afectación pulmonar en la pancreatitis aguda.....	24
1.4.2.1. Edema pulmonar y Factor Inducible por Hipoxia 1 alfa (HIF-1 α).	25
1.5. Vías de señalización intracelular en la pancreatitis aguda.....	27
1.5.1. Proteín Serín/Treonín Fosfatasas (PPPs).	29
1.5.1.1. Proteín Fosfatasas de tipo 1 (PP1).	29
1.5.1.2. Proteín Fosfatasas de tipo 2 (PP2).	29
1.5.2. Proteín Tirosín Fosfatasas (PTPs).....	30
1.5.3. Fosfatasas y pancreatitis aguda.	30
2. OBESIDAD.	32
2.1. Definición.	32
2.2. Epidemiología y etiología.....	34

2.3. Fisiopatología.....	36
2.3.1. Aparato cardiovascular.	36
2.3.2. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.	37
2.3.3. Cáncer.....	37
2.4. Obesidad e inflamación.	38
2.5. Obesidad y pancreatitis aguda.	39
3. ESTRÉS OXIDATIVO.	41
3.1. Concepto de radical libre.	41
3.2. Clases de radicales libres.	41
3.3. Génesis de las especies reactivas de oxígeno.	42
3.3.1. Hemoglobina.	43
3.3.1.1. Metabolismo de la hemoglobina.....	44
3.3.1.2. Actividad peroxidasa de la hemoglobina.....	45
3.4. Antioxidantes.	46
3.4.1. Antioxidantes no enzimáticos.	46
3.4.1.1. El glutatión (GSH).....	46
3.4.1.1.1. Síntesis del glutatión y su regulación.	48
3.4.1.1.2. Degradación del glutatión, ciclo del γ -glutamilo.	48
3.4.1.1.3. Vía de la transulfuración.	49
3.5. Estrés oxidativo.....	50
3.5.1. Concepto de estrés oxidativo.....	50
3.5.2. Daño oxidativo a lípidos.....	51
3.5.2.1. F ₂ -Isoprostanos.	51
3.5.2.2. Malondialdehído (MDA).....	53
3.6. Estrés oxidativo y pancreatitis aguda.	55
II-OBJETIVOS.....	59
III-MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
1. MATERIAL.....	65
1.1. Animales de experimentación.....	65
1.2. Aparatos.....	65
2. MÉTODOS.....	68
2.1. Modelo experimental de pancreatitis aguda necrótica.	68

2.2.	Modelo experimental de lavado peritoneal.	70
2.3.	Diseño del estudio de la pancreatitis aguda necrótica.	71
2.3.1.	Grupos de estudio para conocer el papel de la hemoglobina del líquido ascítico en la evolución local y sistémica de la pancreatitis aguda necrótica.....	71
2.3.2.	Grupos de estudio para el análisis del estrés oxidativo y del metabolismo lipídico en ratas obesas con pancreatitis aguda.	72
2.3.3.	Grupos de estudio para conocer el efecto del lavado peritoneal en la evolución de la pancreatitis aguda en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).....	73
2.4.	Purificación de hemoglobina.....	74
2.4.1.	Fundamento.....	74
2.4.2.	Procedimiento.....	74
2.5.	Técnica de MALDI-TOF.....	75
2.5.1.	Fundamento.....	75
2.5.2.	Procedimiento.....	76
2.5.3.	Cálculos.....	76
2.6.	Determinación de hemoglobina extracelular.....	77
2.6.1.	Fundamento.....	77
2.6.2.	Procedimiento.....	77
2.6.3.	Cálculos.....	77
2.7.	Determinación de la capacidad hemolítica del líquido ascítico.....	78
2.7.1.	Fundamento.....	78
2.7.2.	Procedimiento.....	78
2.7.3.	Cálculos.....	78
2.8.	Determinación cuantitativa de bilirrubina.....	79
2.8.1.	Fundamento.....	79
2.8.2.	Procedimiento.....	79
2.8.3.	Cálculos.....	79
2.9.	Cuantificación de proteínas.....	80
2.9.1.	Fundamento.....	80
2.9.2.	Procedimiento.....	80
2.9.3.	Cálculos.....	80

2.10. Determinación de la actividad peroxidasa.....	80
2.10.1. Fundamento.....	80
2.10.2. Procedimiento.....	81
2.10.3. Cálculos.....	81
2.11. Determinación de malondialdehído.....	82
2.11.1. Fundamento.....	82
2.11.2. Procedimiento.....	82
2.11.3. Condiciones cromatográficas.....	82
2.11.4. Cálculos.....	83
2.12. Determinación de isoprostanos libres.....	83
2.12.1. Fundamento.....	83
2.12.2. Procedimiento.....	84
2.12.3. Cálculos.....	85
2.13. Determinación de glutatión reducido.....	85
2.13.1. Fundamento.....	85
2.13.2. Procedimiento.....	85
2.13.3. Cálculos.....	86
2.14. Aislamiento de ARN.....	87
2.15. Retrotranscripción-amplificación del ARN.....	88
2.15.1. Fundamento.....	88
2.15.2. Retrotranscripción del ARN total.....	88
2.15.3. Análisis del ARN total retrotranscrito por PCR cuantitativa.....	88
2.15.4. Cálculos.....	89
2.16. <i>Western Blot</i>	90
2.16.1. Fundamento.....	90
2.16.2. Procesado de la muestra.....	91
2.16.3. Condiciones del gel y transferencia.....	91
2.16.4. Visualización.....	92
2.16.5. Cuantificación de los resultados.....	92
2.17. Determinación de glutatión oxidado y metabolitos de la vía de la transulfuración.....	93
2.17.1. Fundamento.....	93

2.17.2. Procedimiento.	94
2.17.3. Cálculos.	94
2.18. Determinación de la actividad fosfatasa.	95
2.18.1. Fundamento.	95
2.18.2. Procedimiento.	95
2.18.3. Cálculos.	97
2.19. Determinación de triglicéridos.	97
2.19.1. Fundamento.	97
2.19.2. Procedimiento.	98
2.19.3. Cálculos.	98
2.20. Determinación de ácidos grasos libres.	98
2.20.1. Fundamento.	98
2.20.2. Procedimiento.	98
2.20.3. Cálculos.	98
2.21. Determinación cuantitativa de lipasa pancreática.	99
2.21.1. Fundamento.	99
2.21.2. Procedimiento.	99
2.21.3. Cálculos.	100
2.22. Análisis estadístico.	100
IV-RESULTADOS	101
1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS LOCALES Y SISTÉMICOS DE LA HEMOGLOBINA DEL LÍQUIDO ASCÍTICO ASOCIADA A HEMÓLISIS EN RATAS WISTAR CON PANCREATITIS AGUDA.	103
1.1. Identificación de la hemoglobina extracelular en el líquido ascítico asociado a la pancreatitis aguda.	103
1.2. Efecto hemolítico del líquido ascítico sobre sangre.	104
1.3. Evolución de los niveles de hemoglobina extracelular y de bilirrubina total en líquido ascítico y plasma de ratas <i>Wistar</i> con pancreatitis aguda.	105
1.4. Actividad peroxidasa en líquido ascítico y plasma tras inducción de pancreatitis aguda.	107
1.5. Efecto de la hemoglobina extracelular sobre la formación de necrosis grasa y líquido ascítico en la pancreatitis aguda experimental necrotizante.	108
1.6. Concentración de hemoglobina extracelular y actividad peroxidasa en líquido ascítico de ratas <i>Wistar</i> con pancreatitis aguda y tras administración de hemoglobina.	109

1.7.	Determinación de la concentración de hemoglobina extracelular y bilirrubina total y directa en plasma tras la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina.	110
1.8.	Niveles plasmáticos de malondialdehído e isoprostanos en pancreatitis aguda y tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	112
1.9.	Papel de la hemoglobina administrada intraperitonealmente sobre los niveles de glutatión reducido en páncreas, tejido adiposo abdominal, hígado y pulmón en ratas <i>Wistar</i> con pancreatitis aguda.....	113
1.10.	Expresión de genes implicados en la inflamación en el páncreas de ratas <i>Wistar</i> con pancreatitis aguda tras administración de hemoglobina extracelular.	114
1.11.	Papel de la hemoglobina extracelular en la regulación transcripcional de genes relacionados con la inflamación en el tejido adiposo abdominal de ratas <i>Wistar</i> con pancreatitis aguda.	116
1.12.	Estudio de la transcripción de genes relacionados con la inflamación en hígado en la pancreatitis aguda tras administración de hemoglobina extracelular.	119
1.13.	Análisis en el tejido pulmonar de genes relacionados con la inflamación en la pancreatitis aguda tras administración de hemoglobina extracelular.....	121
1.14.	Infiltración leucocitaria en pulmón de ratas <i>Wistar</i> con pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina.	123
1.15.	Regulación de la expresión de genes diana del Factor Inducible por Hipoxia (HIF-1 α) a nivel hepático y pulmonar en la pancreatitis aguda tras administración de hemoglobina extracelular.	124
2.	ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN RATAS OBESAS CON PANCREATITIS AGUDA.....	129
2.1.	Depleción y oxidación de glutatión en páncreas durante la pancreatitis aguda en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).	129
2.2.	Estudio de la vía de la transulfuración durante la pancreatitis en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).	130
2.3.	Pérdida de la actividad fosfatasa durante la pancreatitis en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).	132
2.4.	Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH) en hígado y pulmón de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) en la pancreatitis aguda.....	134
2.5.	Necrosis grasa y actividad lipasa en grasa abdominal en pancreatitis en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).	134
2.6.	Niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres en plasma y en ascitis de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) con pancreatitis.....	136
2.7.	Niveles de malondialdehído e isoprostanos en pancreatitis en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).	138

3. EFECTO DEL LAVADO PERITONEAL EN LA EVOLUCIÓN DE LA PANCREATITIS AGUDA EN RATAS CONTROL (<i>LEAN</i>) Y OBESAS (<i>ZUCKER</i>).	140
3.1. Efecto del lavado peritoneal sobre la formación de necrosis grasa tras la inducción de pancreatitis en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).	140
3.2. Actividad lipasa pancreática en plasma de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) con pancreatitis y lavado peritoneal.	141
3.3. Niveles de glutatión reducido en páncreas tras la inducción de pancreatitis y aplicación del lavado peritoneal en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).	141
3.4. Análisis de la expresión génica de <i>ho-1</i> y de <i>inos</i> en páncreas de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) con pancreatitis y lavado peritoneal.	142
3.5. Expresión génica de <i>ho-1</i> y de <i>inos</i> en hígado de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) con pancreatitis y lavado peritoneal.	143
3.6. Papel del lavado peritoneal en la regulación transcripcional de genes relacionados con la inflamación en el tejido adiposo abdominal de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) con pancreatitis.	144
3.7. Infiltración leucocitaria en pulmón de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) con pancreatitis aguda y lavado peritoneal.	148
3.8. Estudio de la expresión de genes diana de HIF-1 α en pulmón de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) tras inducción de pancreatitis y realización de lavado peritoneal.	149
V-DISCUSIÓN	151
1. MODELO EXPERIMENTAL DE PANCREATITIS AGUDA.	153
2. LA HEMOGLOBINA EXTRACELULAR CONTRIBUYE A LAS COMPLICACIONES LOCALES Y SISTÉMICAS DE LA PANCREATITIS AGUDA.	156
2.1. La hemólisis en el líquido ascítico asociado a pancreatitis aumenta los niveles de hemoglobina extracelular y la actividad peroxidasa en plasma.	157
2.2. Papel de la hemoglobina extracelular en la respuesta inflamatoria local en la pancreatitis aguda.	160
2.3. La hemoglobina extracelular interviene en el desarrollo de las complicaciones sistémicas de la pancreatitis aguda.	161
3. LAS RATAS OBESAS PRESENTAN MAYORES NIVELES DE NECROSIS GRASA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN LA PANCREATITIS AGUDA.	168
3.1. Papel del estrés oxidativo y los isoprostanos en la pancreatitis aguda y en la obesidad.	169
3.2. Necrosis grasa asociada a la pancreatitis aguda y obesidad.	171
4. EL LAVADO PERITONEAL MEJORA LAS COMPLICACIONES SISTÉMICAS EN RATAS OBESAS CON PANCREATITIS AGUDA.	173
4.1. Efecto del lavado peritoneal sobre las complicaciones locales de la pancreatitis aguda y en la obesidad.	174

4.2. El lavado peritoneal disminuye las complicaciones sistémicas en ratas obesas con pancreatitis aguda.	176
VI-CONCLUSIONES	181
VII-BIBLIOGRAFÍA	185

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	Localización del páncreas.	3
Figura 2.-	Teoría de la colocalización enzimática como fenómeno iniciador de la pancreatitis aguda.	13
Figura 3.-	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y fallo orgánico.	21
Figura 4.-	Regulación de las MAP quinasa.....	28
Figura 5.-	Estructura cuaternaria de la hemoglobina.....	43
Figura 6.-	Degradación del grupo hemo de la hemoglobina.....	44
Figura 7.-	Estructura química del glutatión reducido (GSH).....	47
Figura 8.-	Estructura química del glutatión oxidado (GSSG)..	47
Figura 9.-	Vía de la transulfuración y metilación.....	50
Figura 10.-	Mecanismo de formación de isoprostanos.....	52
Figura 11.-	Proceso de inducción de pancreatitis aguda en rata obesa (<i>Zucker</i>).	69
Figura 12.-	Modelo experimental de lavado peritoneal en rata obesa (<i>Zucker</i>).	70
Figura 13.-	Esquema de la técnica de ELISA directo de competición.....	84
Figura 14.-	Esquema de la técnica de <i>Western blotting</i>	91
Figura 15.-	Actividad peroxidasa del líquido ascítico asociado a pancreatitis aguda.	103
Figura 16.-	Efecto hemolítico del líquido ascítico sobre glóbulos rojos.....	104
Figura 17.-	Evolución de los niveles de hemoglobina extracelular y bilirrubina total en líquido ascítico en la pancreatitis aguda..	105
Figura 18.-	Evolución de los niveles de hemoglobina extracelular y bilirrubina total en plasma en la pancreatitis aguda.....	106
Figura 19.-	Evolución de la actividad peroxidasa en líquido ascítico y plasma en la pancreatitis aguda.	108
Figura 20.-	Cuantificación macroscópica de necrosis grasa y volumen ascítico en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	109
Figura 21.-	Concentración de hemoglobina extracelular y actividad peroxidasa en el líquido ascítico en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.....	110
Figura 22.-	Concentración plasmática de hemoglobina extracelular, bilirrubina total y bilirrubina directa en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina... ..	111

Figura 23.-	Concentración plasmática de malondialdehído y 15-isoprostano F _{2t} en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	112
Figura 24.-	Niveles de glutatión reducido (GSH) en tejido pancreático, tejido adiposo, tejido hepático y tejido pulmonar en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	114
Figura 25.-	Expresión de ARNm de <i>inos</i> y de <i>ho-1</i> en páncreas en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	115
Figura 26.-	Expresión de ARNm de <i>il-1β</i> , <i>il-6</i> e <i>il-10</i> en páncreas en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	116
Figura 27.-	Expresión de ARNm de <i>inos</i> y de <i>ho-1</i> en tejido adiposo abdominal en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.....	117
Figura 28.-	Expresión de ARNm de <i>tnf-α</i> , <i>il-1β</i> , <i>il-6</i> e <i>il-10</i> en tejido adiposo abdominal en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	118
Figura 29.-	Expresión de ARNm de <i>inos</i> y de <i>ho-1</i> en hígado en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.....	119
Figura 30.-	Expresión de ARNm de <i>tnf-α</i> , <i>il-1β</i> , <i>il-6</i> e <i>il-10</i> en hígado en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	120
Figura 31.-	Expresión de ARNm de <i>inos</i> y de <i>ho-1</i> en pulmón en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	121
Figura 32.-	Expresión de ARNm de <i>tnf-α</i> , <i>il-1β</i> , <i>il-6</i> e <i>il-10</i> en pulmón en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	122
Figura 33.-	Actividad mieloperoxidasa (MPO) en pulmón en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	123
Figura 34.-	Expresión de ARNm de <i>vegfa</i> , <i>enos</i> y <i>hexoquinasa-2</i> en hígado en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	125
Figura 35.-	Expresión proteica de VEGFA en hígado en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	126
Figura 36.-	Expresión de ARNm de <i>vegfa</i> , <i>enos</i> y <i>hexoquinasa-2</i> en pulmón en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	127
Figura 37.-	Expresión proteica de VEGFA en pulmón en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.	128
Figura 38.-	Niveles pancreáticos de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) tras la inducción de pancreatitis aguda en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).....	129
Figura 39.-	Caracterización de la vía de la transulfuración en el páncreas de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) en la pancreatitis aguda.	131
Figura 40.-	Actividad fosfatasa en páncreas de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) después de inducción de la pancreatitis aguda.....	133

Figura 41.-	Niveles de glutatión reducido (GSH) en hígado y pulmón tras la inducción de pancreatitis aguda en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).....	134
Figura 42.-	Cuantificación macroscópica de necrosis grasa y presencia de lipasa pancreática en el tejido adiposo abdominal de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) tras la inducción de la pancreatitis aguda.....	135
Figura 43.-	Concentración de triglicéridos (TGL) y ácidos grasos libres (AGL) en plasma y en líquido ascítico en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) tras la inducción de la pancreatitis aguda.	137
Figura 44.-	Niveles de malondialdehído (MDA) y 15-Isoprostano F _{2t} en plasma y líquido ascítico en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) tras la inducción de la pancreatitis aguda.	139
Figura 45.-	Cuantificación macroscópica de necrosis grasa en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) con pancreatitis aguda y lavado peritoneal.....	140
Figura 46.-	Actividad lipasa pancreática en plasma de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) con pancreatitis aguda y lavado peritoneal.	141
Figura 47.-	Niveles de glutatión reducido (GSH) en páncreas de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) con pancreatitis aguda y lavado peritoneal.	142
Figura 48.-	Expresión de ARNm de <i>ho-1</i> y de <i>inos</i> en páncreas de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal.....	143
Figura 49.-	Expresión de ARNm de <i>ho-1</i> y de <i>inos</i> en hígado de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal.	144
Figura 50.-	Expresión de ARNm de <i>ho-1</i> y de <i>inos</i> en tejido adiposo abdominal de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal.	145
Figura 51.-	Expresión de ARNm de <i>tnf-α</i> , <i>il-1β</i> e <i>il-6</i> en tejido adiposo abdominal en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).....	147
Figura 52.-	Actividad mieloperoxidasa (MPO) en pulmón de ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>) en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal.....	148
Figura 53.-	Expresión de ARNm de <i>inos</i> , <i>vegfa</i> , <i>enos</i> y <i>hexoquinasa-2</i> en pulmón en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal en ratas control (<i>lean</i>) y obesas (<i>Zucker</i>).....	150

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Sistema de puntuación modificado de Marshall.	6
Tabla 2.- Enumeración de los criterios clínicos del SRIS.	20
Tabla 3.- Métodos para calcular la grasa corporal.	33
Tabla 4.- Oligonucleótidos específicos utilizados para la qRT-PCR.....	89
Tabla 5.- Oligonucleótidos comerciales (Sondas TaqMan®) utilizados para la qRT-PCR..	90
Tabla 6.- Descripción de los anticuerpos utilizados para <i>Western blotting</i>	93
Tabla 7.- Condiciones experimentales utilizadas en la técnica de espectrometría de masas (HPLC-MS/MS)..	94

ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.
- AGL: ácidos grasos libres.
- AMPc: monofosfato de adenosina cíclico.
- ARN: ácido ribonucleico.
- ARNasa: ribonucleasa.
- ARNm: ARN mensajero.
- ASC: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*.
- ATP: trifosfato de adenosina.
- Bcl-2: proteína del linfoma de célula B 2.
- BLR: bilirrubina.
- BSA: albúmina de suero bovino.
- CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.
- CID: coagulación intravascular diseminada.
- DAP: daño agudo pulmonar.
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica.
- eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial.
- ERK: quinasa regulada por señales extracelulares.
- ERN: especies reactivas de nitrógeno.
- ERO: especies reactivas de oxígeno.
- GCL: γ -glutamil cisteína ligasa.
- GGT: γ -glutamil transpeptidasa.
- GSH: glutatión reducido.
- GSSG: glutatión oxidado.
- Hb: hemoglobina.
- HIF-1: factor inducible por hipoxia 1.
- HK-II: hexoquinasa-2.
- HO-1: hemo oxigenasa 1.
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.
- HRP: peroxidasa de rábano.
- ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1.
- IL: interleuquina.
- iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.
- JNK: quinasa del NH₂ terminal de c-Jun.
- kD: kilodalton.
- LDL: lipoproteínas de baja densidad.
- MALDI-TOF: *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*.
- MAPK: proteín quinastas activadas por mitógenos.
- MAPKK: MAP quinasa quinasa.

- MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos.
- MDA: malondialdehído.
- MPO: mieloperoxidasa.
- NADPH: forma reducida del fosfato del dinucleótido de adenina y nicotilamida.
- NF- κ B: factor nuclear kappa B.
- NG: necrosis grasa.
- NK: *natural killer*.
- NLRP3: *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*.
- NO: óxido nítrico.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PA: pancreatitis aguda.
- PAF: péptido activador de plaquetas.
- PBS: tampón fosfato salino.
- PCA: ácido perclórico.
- PCR: proteína C reactiva.
- PDF: productos de degradación del fibrinógeno.
- PLA₂: fosfolipasa A₂.
- qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.
- RPLP0: proteína ribosomal L0.
- SAM: s-adenosil metionina.
- SDRA: síndrome de distres respiratorio agudo.
- SDS: dodecil sulfato sódico.
- SDS PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.
- SRAC: síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora.
- SRIS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.
- TAB: tejido adiposo blanco.
- TAC: tomografía axial computarizada.
- TAS: tejido adiposo subcutáneo.
- TAV: tejido adiposo visceral.
- TBA: ácido tiobarbitúrico.
- TBARS: especies reactivas del ácido tiobarbitúrico.
- TMB: tetrametilbenzidina.
- TGF- β : factor de transformación de crecimiento β .
- TGL: triglicéridos.
- TLR4: *toll-like receptor 4*.
- TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral α .
- TNF- α : factor de necrosis tumoral α .
- TxA₂: tromboxano A₂.
- VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1.
- VEGF: factor de crecimiento endotelial vacular.
- XDH: xantina deshidrogenasa.
- XO: xantina oxidasa.

I-INTRODUCCIÓN

1. PANCREATITIS AGUDA.

1.1. Definición.

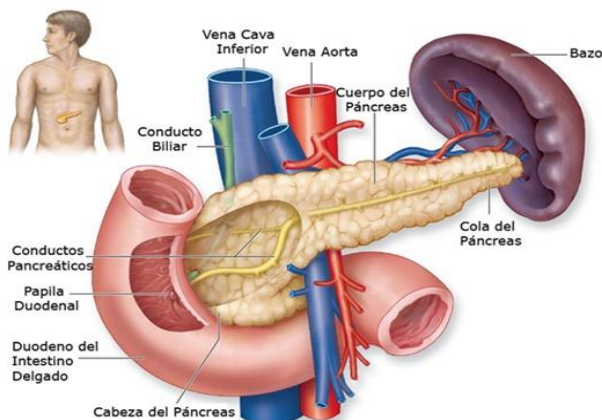
El páncreas es una glándula con una longitud que oscila entre 15-23 cm y con un peso entre 70 y 150 g en el adulto. Está ubicado en el retroperitoneo, en contacto con otros órganos como el duodeno, al cual está unido en el asa duodenal, el estómago en su porción superior, el bazo en la zona de la cola, el colon transverso por delante y el riñón izquierdo (Fig. 1).

Presenta una doble función, endocrina y exocrina. Su función como glándula endocrina se debe a que el 1-2% de sus células son capaces de secretar hormonas en un páncreas adulto, la mayor parte dispuestas en los islotes de Langerhans. El páncreas endocrino está constituido en un 60-75% por células β que segregan insulina y en un 20-25% por células α que segregan glucagón. El resto son células γ y pp que segregan somatostatina y péptido pancreático respectivamente. La mayor parte del tejido pancreático está compuesto por células acinares que se encargan de la secreción de enzimas digestivas.

Las características histológicas y funcionales del páncreas permiten la diferenciación de su patología según se afecte la parte endocrina o exocrina. Entre los procesos patológicos que afectan a la parte endocrina, destaca la alteración de las células β que es la causante de la diabetes *mellitus*. Las afectaciones de la parte exocrina son fundamentalmente de origen inflamatorio y tumoral. Dentro de la patología inflamatoria, por su frecuencia y repercusión, destaca la pancreatitis aguda sobre la crónica.

Los procesos inflamatorios del páncreas están originados por diversos factores etiológicos, algunos de los cuales pueden dar lugar tanto a pancreatitis aguda como crónica. La pancreatitis aguda (PA) es una enfermedad con un amplio espectro clínico. En la mayoría de los casos la enfermedad es leve, autolimitada y mejora en pocos días con medidas terapéuticas sintomáticas. No obstante, en algunas ocasiones se desarrolla de forma súbita como un cuadro de extrema gravedad y resistente a todo tipo de tratamientos. Esta versatilidad en la presentación, en la etiología y en la

Figura 1.- Localización del páncreas.



evolución clínica de la PA no ha facilitado su estudio. La primera explicación de la pancreatitis aguda fue realizada por Fitz en 1889, tras ella se han efectuado muchos intentos de clasificación de la enfermedad, teniendo en cuenta criterios post-mortem o hallazgos operatorios.

Desde principios de los años sesenta se ha intentado unificar criterios de diagnóstico, pronóstico, severidad y manejo de los pacientes con pancreatitis, realizando numerosas reuniones multidisciplinarias de consenso que han incluido profesionales de todas las ramas de la salud y la medicina. El punto culminante a estas reuniones tuvo lugar en el Simposio de Atlanta (Bradley, 1993), destacando que las definiciones, los criterios y las clasificaciones publicadas en esta reunión de expertos siguen vigentes actualmente. Con posterioridad a esta reunión, se han revisado términos para incorporar conceptos modernos de la enfermedad, abordar áreas de confusión, mejorar la evaluación clínica de la severidad de la enfermedad y ayudar a la implantación de nuevos tratamientos (Derwenis, 2000; Uhl y cols., 2002; de Madaria y cols., 2010; Banks y cols., 2013). En base a estas últimas revisiones se han establecido nuevas definiciones.

Pancreatitis aguda: proceso inflamatorio agudo del páncreas, con afectación variable de otros tejidos regionales y sistemas orgánicos alejados. Se manifiesta por la aparición súbita de dolor abdominal acompañado con frecuencia por vómitos, fiebre, taquicardia, leucocitosis, así como elevación de las enzimas pancreáticas en sangre y/u orina.

A nivel morfológico la pancreatitis aguda se divide en dos tipos:

Pancreatitis intersticial edematosa: se caracteriza por un aumento difuso del parénquima pancreático debido al edema inflamatorio, acompañado normalmente de cambios inflamatorios en la grasa peripancreática. También es común la aparición de fluidos peripancreáticos. Los síntomas suelen revertir en la primera semana (Singh y cols., 2011).

Pancreatitis necrotizante: en el 5-10% de los casos se produce la inflamación y la necrosis del parénquima pancreático, del tejido peripancreático o de ambos (Banks y cols., 2013). La evolución de la necrosis es variable, puede permanecer estéril o llegar a ser infecciosa, tener una apariencia sólida o líquida, o ser persistente o desaparecer a lo largo del tiempo. Los pacientes con pancreatitis necrotizante presentan un aumento en la morbilidad y en la tasa de intervenciones comparado con los pacientes que desarrollan la pancreatitis intersticial (Bollen y cols., 2012). La tasa de mortalidad en la pancreatitis necrotizante asciende al 17% respecto al 3% que presenta la pancreatitis intersticial edematosa (Pandol y cols., 2007). El índice de mortalidad dentro de la pancreatitis necrotizante es mayor en aquellos

pacientes que han desarrollado necrosis infecciosa respecto a la necrosis estéril, aproximadamente un 30% frente a un 12% respectivamente (Pandol y cols., 2007).

Si tenemos en cuenta la severidad de la enfermedad, el criterio de clasificación depende de la presencia o no de fallo orgánico y de su duración y/o de la aparición de complicaciones locales o sistémicas. Esta clasificación distingue tres tipos de grados de severidad:

Pancreatitis aguda leve: pancreatitis aguda caracterizada por la ausencia de fallo orgánico y complicaciones sistémicas. Histológicamente se presenta como edema intersticial y revierte en la mayoría de los casos en fases tempranas de la enfermedad. Constituye aproximadamente el 85% de los casos de la práctica clínica y su mortalidad es del 3% (Singh y cols., 2011).

Pancreatitis aguda moderadamente grave: pancreatitis aguda que cursa con fallo orgánico transitorio (revierte en menos de 48 horas) o complicaciones locales o sistémicas en ausencia de fallo orgánico persistente. La pancreatitis aguda moderadamente grave puede resolverse sin intervención o bien requerir el tratamiento prolongado de un especialista, como ocurre en la necrosis estéril sin fallo orgánico. La mortalidad en este tipo de pancreatitis aguda es mucho menor que en la pancreatitis aguda grave (Vege y cols., 2009).

Pancreatitis aguda grave: pancreatitis aguda que en su evolución se caracteriza por la aparición de fallo orgánico persistente, simple o múltiple, y/o complicaciones sistémicas y/o complicaciones locales. Histológicamente se pueden apreciar áreas de necrosis y hemorragia pancreática y peripancreática, (Schölmerich y cols., 1993). Los pacientes que desarrollan fallo orgánico persistente a los pocos días del inicio de la enfermedad presentan un elevado riesgo de mortalidad, 36-50% (Mofidi y cols., 2006). La mortalidad en la pancreatitis aguda grave se incrementa en aquellos pacientes con fallo orgánico persistente y que además desarrollan necrosis infecciosa (Pandol y cols., 2007; Petrov y cols., 2010).

El fallo orgánico viene definido por el análisis de tres sistemas orgánicos, el sistema cardiovascular, el sistema respiratorio y el sistema renal. Se considera fallo orgánico cuando uno de estos tres sistemas presenta un marcador o *score* de dos o más en el sistema de puntuación modificado de Marshall (tabla 1) (Marshall y cols., 1995). Este sistema de puntuación, junto con el SOFA (Vincent y cols., 1996), es útil en una enfermedad dinámica como la pancreatitis aguda porque permite una reevaluación diaria y objetiva del estado del paciente (Vincent y cols., 1996).

Tabla 1.- Sistema de puntuación modificado de Marshall.

Sistema orgánico	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Respiratorio (PaO ₂ /FiO ₂)	>400	301-400	201-300	101-200	≤101
Renal (creatinina sérica, μmol/L)	≤134	134-169	170-310	311-439	>439
Cardiovasc. (presión sistólica, mmHg)	>90	<90 con respuesta de fluido	<90 sin respuesta de fluido	<90 pH<7,3	<90 pH<7,2

A la hora de evaluar la severidad de la pancreatitis aguda para aplicar el tratamiento idóneo, también es necesario conocer las distintas complicaciones, a nivel local y sistémico, que acontecen en el desarrollo de la enfermedad.

Complicaciones sistémicas:

Coagulación intravascular diseminada (CID):

Plaquetas < 100 000/mm³

Fibrinógeno < 80 μg/ml.

Productos de degradación del fibrinógeno (PDF) > 80 μg/ml.

Alteraciones metabólicas severas:

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

Complicaciones locales:

Necrosis pancreática: área local o difusa de parénquima pancreático no viable, asociado de forma característica a necrosis grasa peripancreática. La tomografía axial computarizada (TAC) con contraste intravenoso es la exploración más apropiada para su evaluación (Clavien y cols., 1988; Spanier y cols., 2010), considerándose criterio diagnóstico de necrosis la presencia de zonas bien delimitadas de parénquima pancreático no realzadas tras la administración del contraste (focales o difusas, que midan más de tres centímetros o que afecten a más del 30% del páncreas) (Balthazar y cols., 1990). La sensibilidad de esta exploración para el diagnóstico de necrosis es superior al 90%, por lo cual está considerada como el patrón de referencia para la valoración de esta complicación (Bradley y cols., 1989). Macroscópicamente se aprecian áreas de tejido pancreático desvitalizado y necrosis grasa peripancreática, bien superficiales y dispersas o bien profundas y confluentes. Microscópicamente se caracteriza por una extensa necrosis grasa intersticial, lesiones vasculares y necrosis del parénquima que afecta a las células acinares, a los islotes y a los conductos pancreáticos.

Colección fluida peripancreática aguda: acumulación de líquido en o cerca del páncreas que aparece de forma temprana en el curso de la pancreatitis aguda intersticial edematosa. De forma característica carece de una pared de tejido fibroso o de granulación que la delimite, lo que la diferencia del pseudoquiste pancreático. La mayor parte evoluciona hacia su reabsorción espontánea, aunque puede progresar a pseudoquiste (Lenhart y Balthazar, 2008).

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

Colección necrótica aguda: colección que contiene cantidades variables de líquido y tejido necrótico que aparece durante las primeras cuatro semanas de la enfermedad. A partir de la primera semana es posible distinguir entre la colección fluida y la colección necrótica mediante resonancia magnética, debido a la presencia de material sólido en la colección.

Necrosis walled-off (WON): este tipo de complicación local de la PA consiste en una colección encapsulada de necrosis pancreática o peripancreática en una pared bien definida de origen inflamatorio. La maduración de esta colección ocurre a partir de la cuarta semana desde el

inicio de la pancreatitis necrotizante. Está formada por parénquima pancreático y/o tejido peripancreático necrótico, acompañado en la mayoría de los casos con un proceso infeccioso. La nomenclatura previa de esta complicación recibía términos como necrosis pancreática, necroma, pseudoquiste asociado con necrosis o necrosis pancreática subaguda (Hariri y cols., 1994; Baron y cols., 1996; Petrakis y cols., 2000).

Ascitis: La ascitis pancreática es un término que se reserva para denominar la presencia de gran cantidad de líquido peritoneal rico en enzimas pancreáticas. Se produce por un desgarro del conducto pancreático o de un pseudoquiste, con posterior vertido del jugo pancreático a la cavidad abdominal. El líquido ascítico es hiperproteico (más de 30 mg/ml) y rico en amilasas.

1.2. Epidemiología y etiología.

La pancreatitis aguda es una enfermedad de gran importancia debido a su frecuencia relativamente alta, y a una incidencia creciente en nuestros días. En Estados Unidos fue la causa más frecuente de ingreso hospitalario de origen gastrointestinal en 2009 con 275000 hospitalizaciones (Peery y cols., 2012), más del doble de ingresos que se contabilizaron en 1988 (Yang y cols., 2008). A pesar de las dificultades de ratificar los estudios epidemiológicos por las variaciones geográficas, los métodos de diagnóstico y la contabilización de brotes repetidos, los datos estudiados muestran una incidencia anual de 13 a 45/100000 personas (Yadav y Whitcomb, 2010; Satoh y cols., 2011; Shen y cols., 2012). En España, del total de urgencias médicas se calcula que del 0,2-0,6% son pancreatitis aguda y suponen del 0,7 al 4% de los ingresos hospitalarios (Aparisi y Raga, 1991).

La etiología de la enfermedad es variada, encontrándonos con dos principales causas etiológicas, las enfermedades de origen biliar y el alcoholismo. Un 10% son debidas a causas no comunes como procedimientos quirúrgicos, infecciones, tóxicos o isquemia, y de un 10% a un 30% no se llega a encontrar la causa, denominándolas pancreatitis agudas idiopáticas (Yadav y Lowenfels, 2013). En los últimos años, ha cobrado mayor protagonismo la obesidad como factor de riesgo en el aumento de la incidencia de la PA. Individuos con una circunferencia abdominal mayor a 105 cm, tienen un riesgo dos veces mayor a desarrollar PA respecto a aquellos individuos con una circunferencia comprendida entre 75 y 85 cm. La obesidad también incrementa la severidad y la mortalidad en la pancreatitis aguda (Hong y cols., 2011).

Las diferencias encontradas en la etiología de la enfermedad se deben al género, edad y raza. Aunque la proporción, entre hombre y mujeres, de desarrollar la PA es la misma, el sexo y la edad influyen en la base etiológica

de la enfermedad. La pancreatitis de causa alcohólica es más común en hombres, aunque las diferencias de sexo se igualan si el consumo de alcohol es similar (Lankisch y cols., 2002). En mujeres, la pancreatitis aguda se relaciona más con litiasis biliar, enfermedades autoinmunes o con un origen idiopático (Yadav y Lowenfels, 2013).

La edad más frecuente de aparición de la pancreatitis aguda se sitúa entre los 30 y los 70 años, con un pico a los 55 años (Singh y cols., 2011).

Por último, cabe destacar que el riesgo de pancreatitis aguda es de dos a tres veces mayor en la población negra respecto a la población blanca (Yang y cols., 2008). Serían necesarios más estudios para conocer si las diferencias observadas resultan de la dieta, genética u otros factores.

1.3. Patogenia.

La secuencia de sucesos y mecanismos moleculares, desencadenados por los diferentes factores etiológicos, que originan el daño tisular y la inducción de la pancreatitis aguda continúan siendo objeto de estudio en la actualidad.

Los acontecimientos iniciales en la pancreatitis aguda tienen lugar en la propia célula acinar (Sah y cols., 2012). Desde hace más de un siglo se ha hipotetizado con la activación patológica intraacinar del tripsinógeno como mecanismo central de la enfermedad (Chiari, 1896). Por otro lado, y al mismo tiempo que se produce la activación de las enzimas digestivas, se originan una serie de procesos inflamatorios locales independientes de la activación del tripsinógeno (Dawra y cols., 2011). Estos procesos serán responsables de la cascada inflamatoria que dará lugar al daño tisular del páncreas y a las posteriores complicaciones sistémicas de la enfermedad, utilizando como mediadores inflamatorios, citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, especies reactivas del oxígeno (ERO), calcio, factor de activación plaquetario o adenosina (Grady y cols., 1997; Pereda y cols., 2006). La activación de NF-κB en las células acinares, en los estadios iniciales de la enfermedad, puede ser el origen de los procesos inflamatorios locales anteriormente mencionados (Huang y cols., 2013).

Por tanto, la activación de las enzimas proteolíticas y la respuesta inflamatoria en las células acinares pueden considerarse como los principales sucesos moleculares que acontecen en el inicio de la pancreatitis aguda.

1.3.1. Activación intracelular de los zimógenos.

La secreción pancreática desempeña un papel crucial en la transformación de los principios que contienen los alimentos en moléculas simples que pueden ser utilizadas por el organismo. En la regulación de la secreción pancreática intervienen mecanismos nerviosos, que son importantes para una regulación fina de la secreción, y fundamentalmente, mecanismos hormonales, destacando entre ellos el papel de dos hormonas, la secretina y la colecistoquinina.

La secretina es una hormona liberada en respuesta a la comida y produce la secreción de la fracción hidroelectrolítica del jugo pancreático, rica en bicarbonato, cloro, sodio y potasio, capaz de neutralizar el quimo ácido tamponándolo. La colecistoquinina, liberada en respuesta a los productos de la digestión de grasas y proteínas, provoca la secreción de la fracción enzimática. En su composición se encuentran gran cantidad de enzimas digestivas sintetizadas en las células acinares, y su secreción no aumenta de forma significativa el volumen de líquido. Estas enzimas (lipasa, amilasa, carboxipeptidasa, elastasa, tripsina y quimotripsina) son los componentes con mayor interés funcional y clínico del jugo pancreático (Navarro y cols., 2002).

Debido a la capacidad destructiva de la fracción enzimática, el páncreas debe protegerse mediante una serie de estrategias para evitar ser autodigerido. Una de estas estrategias es secretar las enzimas proteolíticas en formas no activas, denominadas zimógenos, activándose posteriormente en la luz intestinal. Las proenzimas se sintetizan en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso, que tras pasar a las cisternas del aparato de Golgi se asocian en los denominados gránulos de zimógeno. El tripsinógeno, forma inactiva de la tripsina, se activa por la enteroquinasa de los enterocitos de la pared intestinal. La tripsina, a su vez, activa más tripsinógeno y también activa al quimotripsinógeno y a la pro-carboxipeptidasa. Otra estrategia es la síntesis de inhibidores de las enzimas secretadas por el páncreas, como es el inhibidor intrapancreático de la tripsina (α_1 -antitripsina).

Chiari, en 1896, describió que la enfermedad estudiada años antes por Fitz se producía por la autodigestión del páncreas debido a la acción de sus propias propiedades digestivas (Chiari, 1896). Las ideas de Chiari propiciaron multitud de investigaciones y han servido de base durante muchos años para el estudio de la patogenia de la enfermedad. Años después, Opie expuso la teoría del canal común (Opie, 1901), postulando que la oclusión, a nivel de la ampolla de Vater, originaría un canal común que permitiría el flujo de bilis al páncreas, causando pancreatitis aguda. Otra teoría tendría como causa de la enfermedad el reflujo duodenal, que debido a un mal funcionamiento del esfínter de Oddi,

este flujo pasaría al páncreas, digiriéndolo (McCutcheon y Race, 1962). Incluso la obstrucción del conducto pancreático por sí solo puede desencadenar una PA por el aumento de presión intraductal (Austin y cols., 1980).

A raíz de las ideas de Chiari se llevaron a cabo investigaciones para evitar la autodigestión, limitando la secreción de enzimas e inhibiendo enzimas pancreáticas. Los resultados inicialmente esperanzadores se transformaron en fracasos al mantenerse los efectos sistémicos de la enfermedad (Büchler y cols., 1993), aunque otros datos experimentales muestran el papel local de la tripsina en la pancreatitis aguda. De hecho, se puede detectar la presencia de tripsina antes del daño celular acinar y también el péptido que se libera tras su activación, denominado péptido de activación del tripsinógeno (Otani y cols., 1998). Además, los pacientes con pancreatitis hereditaria presentan una mutación del tripsinógeno que da lugar a una tripsina resistente a la inactivación (Whitcomb, 1999). Un estudio reciente demostró que la activación de tripsina en las células acinares es suficiente para causar inflamación y muerte celular, empleando un constructo condicional de tripsinógeno activado mediante modificación post-traducciona (Gaiser y cols., 2011).

Tomando como punto de partida en la patogenia de la PA el proceso de activación prematura de los gránulos de zimógeno, a principios de los años ochenta se observó un proceso de colocalización de los gránulos de zimógeno, cargados de enzimas digestivas, con hidrolasas lisosomales en las fases iniciales 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 (Fig. 2). Otros modelos experimentales mostraron el mismo proceso, tanto por estimulación con ceruleína como por obstrucción del conducto pancreático, llegándose a observar también fenómenos de endocitosis de enzimas secretadas y alteraciones del transporte de los gránulos de zimógeno (Watanabe y cols., 1984; Saluja y cols., 1989). Se ha demostrado que la catepsina B presente en los lisosomas es capaz de activar al tripsinógeno (Halangk y cols., 2002) y que los ratones *knockout* de catepsina B presentan menores niveles de tripsina intrapancreática tras la inducción experimental de la PA, aunque no se consigue disminuir la respuesta inflamatoria sistémica (Halangk y cols., 2000).

Sin embargo, diversas evidencias han cuestionado esta teoría, como 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 PA, ni su administración *in vitro* reduce los niveles de activación del tripsinógeno (Steer, 2002). Recientemente, se ha demostrado que la redistribución celular de la catepsina B formando

vacuolas proteolíticas, no ocasiona la activación intracelular del tripsinógeno ni la inducción de pancreatitis aguda (Meister y cols., 2010).

Distintas líneas de investigación han buscado otros mecanismos que intentaran explicar la activación intracelular de la tripsina, como la originada por la NADPH oxidasa de los neutrófilos (Gukovskaya y cols., 2002).

El calcio citosólico también puede desempeñar un papel importante en los procesos de activación temprana de las enzimas digestivas de las células acinares en el marco de la pancreatitis aguda (Mooren y cols., 2003; Criddle y cols., 2007). En este contexto, el estudio de las vías de señalización del calcio para conocer sus principales fuentes es crucial para establecer la importancia de este ion en el desarrollo de la enfermedad (Voronina y cols., 2010). La inhibición farmacológica y genética del canal 3 de los receptores de potencial transitorio (TRPC3) en las células acinares, canal involucrado en el transporte de calcio a través de membrana, mostró una disminución en la activación intraacinar de los zimógenos y como consecuencia, una menor severidad en el desarrollo de la pancreatitis aguda en ratones (Kim y cols., 2011).

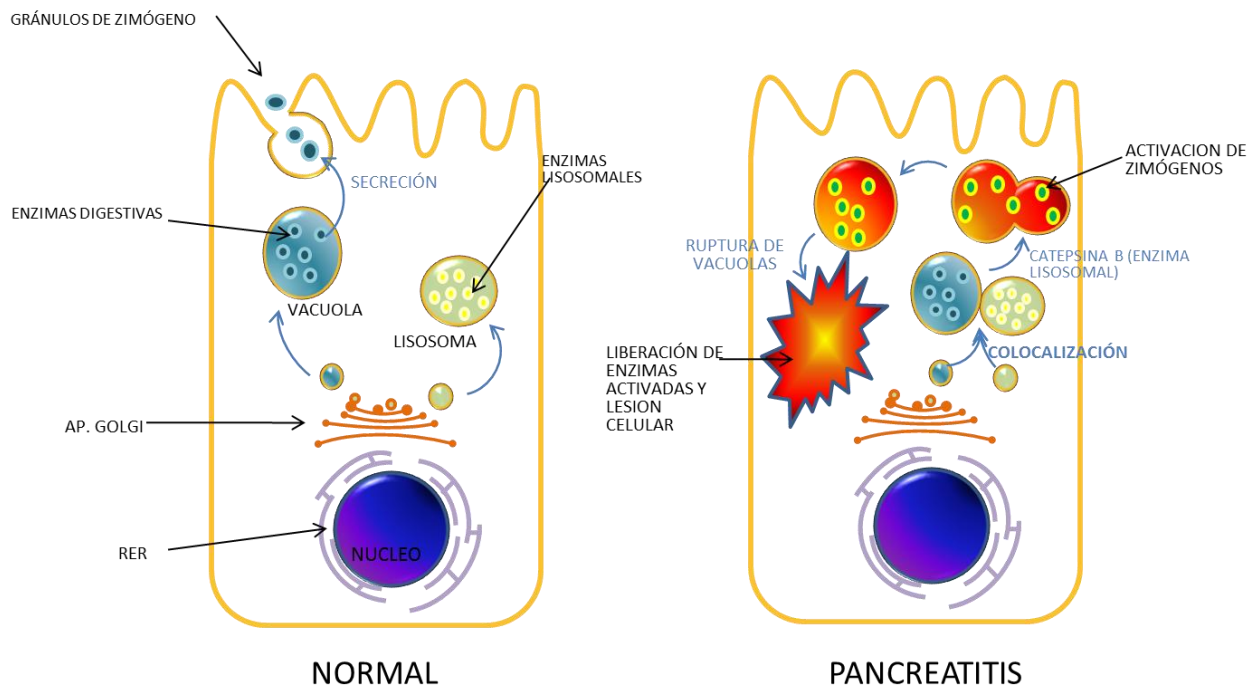
Además del calcio, otro factor estudiado recientemente en las fases iniciales de la pancreatitis aguda es el pH extracelular (pHe). Una disminución del pHe de 7,4 a 7,0 provoca una activación en la célula acinar que desencadena el desarrollo de la pancreatitis tanto *in vivo* como *in vitro* (Bhoomagoud y cols., 2009). Probablemente, el efecto nocivo de un pHe bajo sobre las células acinares es a través de cambios originados en las vías de señalización del calcio. La inhibición de los receptores de rianodina (RyR) de la membrana del retículo endoplásmico, encargados de la liberación de calcio, reducen significativamente los efectos de la disminución del pHe sobre la activación de zimógenos y como consecuencia, el daño celular. Estos resultados sugieren que el aumento en la liberación de calcio, mediante estos receptores, en la membrana basolateral de la célula acinar es debido a los efectos de un pHe bajo en el páncreas exocrino (Reed y cols., 2011).

Entre los últimos estudios que intentan esclarecer el inicio de la pancreatitis aguda, se encuentra las teorías que relacionan la autofagia con el proceso de activación temprana de los zimógenos. La autofagia es un mecanismo de degradación lisosomal, cuya función principal es el mantenimiento de la homeostasis y supervivencia celular. Sin embargo, este proceso está relacionado con diferentes enfermedades (Choi y cols., 2013). Los niveles basales de autofagia en páncreas exocrino de ratón están incrementados respecto a los niveles en riñón, hígado, corazón o páncreas endocrino, debido a la elevada tasa de síntesis proteica que tiene lugar en las células acinares (Mizushima y cols., 2004). Actualmente, el papel de la autofagia en la pancreatitis aguda está en discusión. Por un lado, la autofagia

puede ocasionar daño en las células acinares a través de la activación de tripsinógeno a tripsina, por la acción de los lisosomas (Hashimoto y cols., 2008). Por otro lado, una deficiencia en la actividad autofágica está asociada con un desequilibrio entre la catepsina L, degrada tripsinógeno y tripsina, y catepsina B, convierte tripsinógeno en tripsina, resultando en una acumulación intraacinar de tripsina activa. Por tanto, una insuficiente actividad lisosomal puede ser responsable del aumento de tripsina intracelular en la pancreatitis (Mareninova y cols., 2009).

Recientemente, otro grupo ha descrito la autofagia como un proceso selectivo llamado zimofagia. La zimofagia se caracteriza por prevenir la muerte celular en las fases iniciales de la pancreatitis, evitando la activación temprana de los zimógenos (Grasso y cols., 2011).

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



1.3.2. Respuesta inflamatoria en la pancreatitis aguda.

En las fases iniciales de la pancreatitis aguda, paralelamente a la activación intracelular del tripsinógeno, se producen una serie de procesos inflamatorios dependientes de la activación de citoquinas y del factor de transcripción NF- κ B.

NF- κ B es un factor de transcripción que desempeña un papel fundamental en la respuesta inflamatoria en mamíferos (Napetschnig y Wu, 2013). Resultados actuales sugieren que la activación de NF- κ B es un proceso independiente de la activación del tripsinógeno. Se observó que la inducción de la expresión de tripsina activa *in vitro* no provocó cambios en la actividad de NF- κ B (Ji y cols., 2009).

En el contexto de la pancreatitis aguda, NF- κ B interviene en la patogénesis y desarrollo de la enfermedad (Baumann y cols., 2007). Como se ha mencionado anteriormente, NF- κ B se activa en fases tempranas de la pancreatitis, y esta activación sucede tanto en leucocitos como en las propias células acinares (Vaquero y cols., 2001). La sobreexpresión de IKK2, un mediador en la activación de NF- κ B, es suficiente para inducir PA (Baumann y cols., 2007). De hecho, se produce edema, necrosis e infiltración leucocitaria a través de la regulación de genes diana de NF- κ B (Baumann y cols., 2007). En ratones deficientes del factor NF- κ B, tras inducción de PA mediante ceruleína, se observó una disminución en el daño histológico y en la expresión de TNF- α (Altavilla y cols., 2003).

1.3.2.1. Citoquinas.

Las citoquinas son polipéptidos o glicoproteínas liberadas fundamentalmente por las células del sistema inmunológico. La principal función de las citoquinas es actuar como mediadores intercelulares mediante la modulación de la respuesta inflamatoria. Constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que comparten propiedades y funciones características, se producen en cantidades muy pequeñas durante las fases efectoras de la inmunidad natural y específica (lo que las hace difícilmente detectables) y sirven para regular las respuestas inmunitaria e inflamatoria. En ocasiones regulan también la división celular y/o tienen capacidad quimiotáctica (Medzhitov y cols., 2011).

La secreción de citoquinas es breve, autolimitada y su síntesis se inicia por activación de la expresión de los genes que las codifican. Algunos miembros de las distintas familias de citoquinas pueden regularse por mecanismos post-traduccionales, siendo un ejemplo la liberación proteolítica de un producto activo (Zheng y cols., 2013). Las citoquinas pueden desempeñar función autocrina, paracrina y endocrina, requiriendo la síntesis de ARN

mensajero para la mayoría de las respuestas que provocan (Vona-Davis y Rose, 2007).

Las citoquinas pro-inflamatorias están elevadas en diferentes modelos de PA y en pacientes con PA grave. El bloqueo específico de estas citoquinas en modelos experimentales de PA produce una menor afectación sistémica y una mejoría en la supervivencia (Mayer y cols., 2000; Luan y cols., 2013). Además, se ha observado que ciertos polimorfismos genéticos hallados en la secuencia de TNF- α y en la de IL-6 están relacionados con la severidad y la etiología de la PA respectivamente (de Madaria y cols., 2008).

Los niveles de citoquinas se han intentado emplear como marcadores específicos de severidad en la pancreatitis aguda. Todas pueden tener relevancia en este aspecto, pero los resultados más satisfactorios se han logrado con la IL-6, IL-8, IL-10 y los receptores solubles de TNF- α por su estabilidad y fiabilidad de medida (Gunjaca y cols., 2012; Fisic y cols., 2013).

Las citoquinas son liberadas principalmente por los macrófagos pancreáticos activados y los neutrófilos que infiltran la glándula tras el inicio de la PA, como respuesta a la lesión focal pancreática (Viterbo y cols., 2008; Sandler y cols., 2013). Además, las células acinares pueden llegar a comportarse como células inflamatorias y sintetizar y liberar citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión (de Dios y cols., 2005). En resumen, los leucocitos, junto con las células acinares, desencadenan la cascada inflamatoria en respuesta al daño local del páncreas, siendo los macrófagos activados responsables de la respuesta sistémica (Naskalski y cols., 2007).

1.3.2.1.1. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

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

Las células que mayor cantidad de TNF- α sintetizan son los monocitos y los macrófagos, aunque también lo producen los linfocitos B y T, las células NK, los astrocitos, las células de Kupffer, los queratinocitos, las células de Paneth, los enterocitos, las células musculares lisas, las células acinares y cierto tipo de líneas celulares tumorales. El principal estímulo para su producción es el lipopolisacárido, pero su producción se ve aumentada también en respuesta a bacterias, virus, citoquinas (IL-1, IL-2 o GM-CSF), complejos

inmunológicos (complejo mayor de histocompatibilidad), radiación X, cristales de urato, factor C5a del complemento y ERO (Chu, 2013).

El TNF- α tiene dos receptores, codificados por genes diferentes, que se conocen como p55/TNFR₁ y p75/TNFR₂, de 55 y 75 kDa respectivamente. El TNFR₁ se expresa en numerosos tipos celulares, mientras que el TNFR₂ se encuentra predominantemente en leucocitos y células endoteliales. La porción intracelular del receptor TNFR₁ contiene el *dominio de muerte* que se requiere para la apoptosis y la activación de NF- κ B. El reclutamiento de determinadas proteínas, como proteínas asociadas a Fas o a la caspasa-8, conducen a apoptosis, mientras que el reclutamiento del factor 2 asociado al receptor de TNF- α y la *receptor-interacting protein* conlleva activación de JNK y de NF- κ B (Hallenbeck, 2002).

En el estudio de la pancreatitis aguda, se ha observado elevación de los niveles séricos de TNF- α (Grewal y cols., 1994; Norman y cols., 1995). Los receptores solubles, la parte extracelular de los receptores de TNF- α , también se liberan en los estadios tempranos de la enfermedad, coincidiendo con el incremento de TNF- α (Granell y cols., 2004).

La liberación del TNF- α se produce desde diferentes tejidos en el curso de la pancreatitis aguda. Aunque las células acinares pueden producir TNF- α , los leucocitos del infiltrado inflamatorio dentro del tejido pancreático son considerados la fuente principal (Norman, 1998). Cabe destacar que la concentración de TNF- α dentro del tejido pancreático es varias órdenes de magnitud superior que la encontrada en el suero y por tanto podría ser tóxica para las células. En consecuencia, el TNF- α puede contribuir a la severidad de la pancreatitis por medio de la inducción de apoptosis o de necrosis en las células acinares (Norman, 1998, Sandler y cols., 2013). Nuestro grupo ha observado anteriormente que la inhibición del TNF- α por la pentoxifilina disminuye marcadamente el infiltrado inflamatorio, el edema y la depleción del glutatión en páncreas, así como la actividad lipasa en suero tras la pancreatitis inducida por ceruleína en ratas (Gómez-Cambronero y cols., 2000). De forma similar, observamos que la pentoxifilina, a través de la inhibición de TNF- α , disminuía la expresión de genes pro-inflamatorios *in vitro* en células AR42J (Escobar y cols., 2012a).

1.3.2.1.2. Interleuquina 1 (IL-1).

La interleuquina IL-1 es una potente citoquina pro-inflamatoria. Se sintetiza fundamentalmente en los macrófagos activados, aunque también es común su síntesis en células epiteliales y endoteliales (Huang y cols., 2013). 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 (Dinarello y cols., 2009).

La actividad de la IL-1, al tratarse de una citoquina muy potente, está estrechamente regulada en varios niveles. La expresión de IL-1 α e IL-1 β está inducida por la activación de NF- κ B, a través de la exposición de los macrófagos a un agonista del TLR4, el lipopolisacárido y también mediante la capacidad de la IL de activarse a sí misma (Contassot y cols., 2012). IL-1 α e IL-1 β son expresadas como proproteínas (proIL-1 α y proIL-1 β). La proIL-1 α tiene la capacidad de unirse directamente al receptor de la IL-1 (IL-1RI) y su proteólisis tan sólo originaría un aumento en la actividad biológica de la citoquina (Afonina y cols., 2011). En cambio, la proIL-1 β no puede interactuar con el receptor de la IL-1 (IL-1RI), por lo que requiere la acción proteolítica intracelular de la caspasa-1 (Martinon y cols., 2009). A su vez, esta caspasa es controlada por varios complejos multimoleculares citosólicos denominados inflamomas, siendo el NLRP3 el más importante. La activación de NLRP3, mediante los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a peligro (DAMPs), induce cambios conformacionales que permiten el reclutamiento de la proteína adaptadora ASC, que a su vez interactúa con la procaspasa-1 inactiva, a través del dominio CARD, presente en ambas proteínas. Finalmente, la caspasa-1 activada es la responsable de la maduración de pro-IL-1 β (Strowig y cols., 2012).

A nivel pancreático, se comprobó a mediados de los años noventa que la fuente inicial de IL-1 β en el curso de la PA experimental son los macrófagos, siendo estos productores más activos incluso que los neutrófilos que infiltran la glándula tras la inducción de la pancreatitis (Fink y Norman, 1996). Años más tarde, se observó que en ausencia de IL-1 no se consigue el máximo grado de inflamación, necrosis y edema asociado a la PA, e incluso se consigue disminuir la severidad al atenuar ligeramente la mortalidad de la misma (Denham y Norman, 1999). Actualmente, y tras el descubrimiento del inflamoma, se ha visto que ASC, caspasa-1 y NLRP3 son necesarios para el desarrollo de la pancreatitis aguda a través de la activación de la IL-1 β (Hoque y cols., 2011).

1.3.2.1.3. Interleuquina 6 (IL-6).

La IL-6 se produce por numerosas células como son los macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células musculares lisas. Es la principal citoquina mediadora de la síntesis de las proteínas de fase aguda como la PCR, el fibrinógeno y la haptoglobina y su administración induce pirexia. La IL-6 se sintetiza en respuesta al estímulo de TNF- α , IL-1 y endotoxina. Esta

citoquina es el inductor primario de la respuesta proteínica de fase aguda (Mihara y cols., 2012). Su importancia radica en que su detección en suero es rápida y fiable, siendo detectable desde los 60 minutos después de iniciarse su producción hasta 10 días más tarde (con un máximo a las 4-6 h). Aprovechando esta propiedad, varios trabajos clínicos han conseguido correlacionar los niveles de IL-6 en suero con la severidad de la PA (Gunjaca y cols, 2012).

1.3.2.1.4. Interleuquina 10 (IL-10).

La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria que modula la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias 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 del receptor soluble p75 del TNF- α (Commins y cols, 2008). La mayoría de los trabajos experimentales que utilizan IL-10, o alguno de sus agonistas (IT9302), como agente terapéutico disminuyen la severidad y la mortalidad de la PA al disminuir la expresión del gen del TNF- α (Kotenko y cols., 2001).

1.4. Fisiopatología. Efectos sistémicos de la pancreatitis aguda.

La pancreatitis aguda muestra una tasa de mortalidad relativamente elevada debido a los distintos efectos sistémicos que se originan. A finales del siglo XIX, Fitz relacionaba la severidad de la enfermedad con la hemorragia pancreática y la necrosis grasa diseminada. Casi un siglo después se pensaba que el shock era la causa más importante de mortalidad inmediata (Fry, 1988). Pasados unos años, en la reunión de Atlanta, se habló de las complicaciones locales y del fallo orgánico extrapancreático como principales responsables en la evolución de la gravedad de la enfermedad (Bradley, 1993). Recientemente, se ha postulado al fallo orgánico como factor determinante en la severidad de la pancreatitis aguda, en ausencia o no de las complicaciones locales (Pandol y cols., 2007; Vege y cols., 2009). En la actualidad, y tras la revisión de diversos estudios estadísticos se puede concluir que la mortalidad causada por el fallo orgánico asociado a la pancreatitis aguda es de aproximadamente un 30%, alcanzando la cifra de 60% si el fallo orgánico se acompaña de necrosis infecciosa (Petrov y cols. 2010).

Entre los fallos orgánicos que pueden desarrollarse en la pancreatitis aguda, destacan aquellos que afectan a los sistemas cardiovascular, renal y pulmonar. Otros órganos o sistemas también pueden verse perjudicados por los efectos sistémicos de la pancreatitis aguda. En la barrera intestinal pueden producirse cambios en la permeabilidad que pueden conducir a una

translocación bacteriana y como consecuencia, el inicio de complicaciones sépticas (de Madaria y cols., 2005; Koh y cols., 2012). En el tejido adiposo, un fenómeno que puede ocurrir es la formación de áreas de lesión llamadas necrosis grasa, de características similares a la paniculitis nodular. La liberación de la lipasa pancreática y como consecuencia, el aumento de ácidos grasos libres y halogenados puede causar la necrosis tisular en el tejido adiposo abdominal de ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico (Lee y cols., 1979; Ellis y cols., 2009; Franco-Pons y cols., 2013). Los pacientes con necrosis grasa extrapancreática presentan una tasa de mortalidad aproximadamente de un 9%, sino existe necrosis pancreática, y de un 30% si ésta se genera (Bakker y cols., 2012).

A nivel cardiovascular, las manifestaciones más comunes que tienen lugar en el desarrollo de la enfermedad son shock e hipoperfusión tisular. Ambas manifestaciones están causadas por la considerable hipovolemia que existe en la pancreatitis aguda grave debida a la pérdida de líquido hacia regiones extravasculares (Yegneswaran y cols., 2011). En estos casos, la restauración del volumen intravascular es la primera estrategia terapéutica para reducir el fallo circulatorio y la mortalidad en la PA. En las pancreatitis necróticas también hay un aumento del gasto cardíaco, disminuyéndose las resistencias periféricas y aumentando las resistencias pulmonares con respecto a las pancreatitis leves (Beger y cols., 1986). Recientemente, se ha comprobado mediante electrocardiograma, que la PA es capaz de modificar el intervalo ST como sucede en los infartos de miocardio (Hsu y cols., 2010). En todo caso, es importante conocer si el fallo hemodinámico es consecuencia de la disminución de la precarga o bien por disfunción miocárdica, para una correcta elección del tratamiento a realizar (Yegneswaran y cols., 2011).

La insuficiencia renal es una complicación frecuente, provocada por la hipovolemia y la hipoperfusión, que conduce a una necrosis tubular aguda. Menos de un 5% de los pacientes con pancreatitis aguda sufren esta complicación, pero aparece en un 20% de los que requieren cuidados intensivos. Más de un 70% de pacientes con fallo renal agudo en la pancreatitis mueren, debido a una mayor afectación sistémica (Petejova y Martinek, 2013).

1.4.1. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) es un término acuñado por primera vez a comienzo de los años ochenta para dar explicación a las múltiples etiologías que convergían en fallo multiorgánico. Rinderknecht propone que son los mediadores de la inflamación los que provocan la activación de las células inmunológicas en órganos a distancia, y que la sobreestimulación o la respuesta incontrolada de estas células daría lugar a las

lesiones tisulares que harían fracasar los diferentes órganos hasta entrar en el fracaso multisistémico (Rinderknecht, 1988). De esta forma, el nexo entre la lesión pancreática, proceso aparentemente local, y la lesión de órganos a distancia serían los mediadores de la inflamación. Este fenómeno convierte a la PA en una enfermedad con consecuencias sistémica.

La pancreatitis aguda grave puede considerarse como bifásica. La primera fase se corresponde con un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) (tabla 2) que conduce al fallo multiorgánico responsable de la mortalidad inicial, que puede alcanzar el 60% de los pacientes fallecidos por PA, especialmente cuando existe afectación pulmonar (Rubenfeld y cols., 2005; Andersson y cols., 2010). Si fallan los mecanismos de defensa natural o falla la intervención terapéutica, se desarrollará una segunda fase caracterizada por la aparición de complicaciones locales y del síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora (SRAC). El SRAC deprime el sistema inmune y facilita la susceptibilidad del organismo a las complicaciones sépticas nosocomiales, incluidas las que tienen su origen en la necrosis infecciosa de la pancreatitis aguda, creando un segundo pico de mortalidad (Neoptolemos y cols., 1998; Mayerle y cols., 2012).

Tabla 2.- Enumeración de los criterios clínicos del SRIS.

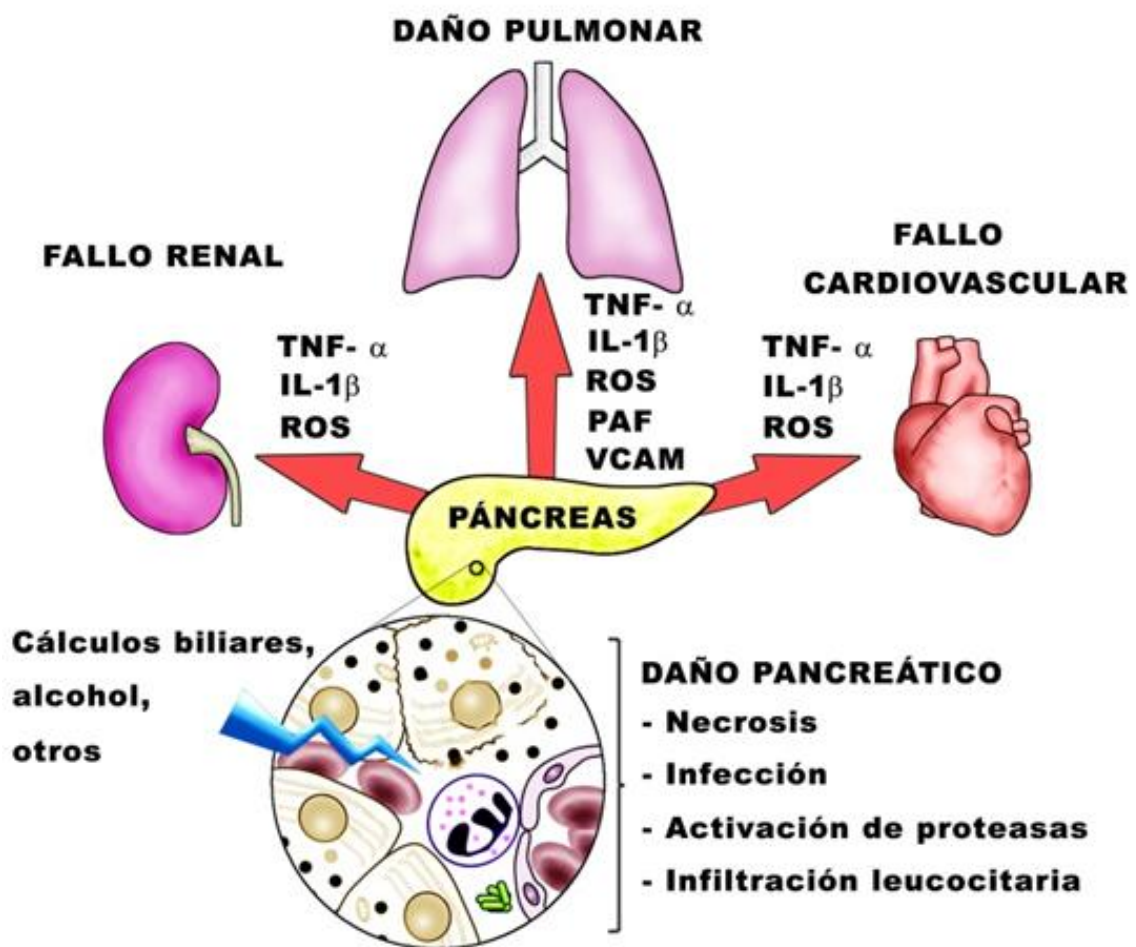
CRITERIOS CLÍNICOS DEL SRIS (se deben cumplir dos o más)	
Temperatura	> 38° C o < 36° C
Frecuencia cardíaca	> 90 latidos / minuto
Frecuencia respiratoria	> 20 respiraciones / minuto
Recuento leucocitos	> 12x10 ⁹ /L, < 4x10 ¹² /L ó > 10% de inmaduros

Se considera que el SRIS surge por el descontrol de la respuesta inflamatoria, necesaria ante determinadas agresiones que, en condiciones normales, quedaría confinada al órgano de origen por la acción de inhibidores, agentes antiinflamatorios o mecanismos de contrarregulación. Participan en el SRIS los denominados mediadores de la inflamación, clasificados en: componentes celulares, (sobre todo macrófagos y neutrófilos), mediadores de

origen celular y mediadores de origen humoral. La pancreatitis aguda es por tanto un modelo ideal para estudiar estos procesos de inflamación sistémica (Carnovale y cols., 2005).

El fracaso orgánico hace referencia a la evolución del SRIS, y se define como el síndrome progresivo, potencialmente reversible, de fallo orgánico que afecta al sistema cardiovascular, al sistema renal y/o al sistema respiratorio (Fig. 3). Los síntomas pueden variar entre una disfunción leve transitoria y el fallo irreversible de un órgano, siendo la mortalidad directamente proporcional a la rapidez de instauración y al número de órganos afectados (Thandassery y cols., 2013).

Figura 3.- Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y fallo orgánico.



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

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

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

Las células endoteliales expresan una serie de moléculas reguladoras de la marginación y adherencia de los neutrófilos como la P-selectina, la E-selectina, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) (Frossard y cols., 1999). La expresión de dichas moléculas se induce por la presencia bien de citoquinas como el TNF- α , o bien por la presencia de especies reactivas del oxígeno (Folch y cols., 1999). Numerosas evidencias experimentales indican reclutamiento de neutrófilos por el pulmón y una elevada permeabilidad vascular pulmonar (Bhatia y cols., 1998). En modelos experimentales de PA se ha observado que la interferencia en cualquiera de las cuatro fases señaladas anteriormente, en especial las dos primeras, atenúa la gravedad de la afectación pulmonar (Lundberg y cols.,

2000). Los mastocitos podrían incluso formar parte del componente celular implicado ya que, situados en vecindad de los vasos de la mayoría de los tejidos, liberan citoquinas, serotonina e histamina que participan en los cambios de la microcirculación típicos de la respuesta inflamatoria asociada a la PA (Dib y cols., 2002).

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

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

Es importante destacar la fracción C5a del sistema del complemento. Esta fracción es un potente mediador pro-inflamatorio que estimula la contracción del músculo liso, incrementa el flujo vascular y la permeabilidad capilar y atrae los neutrófilos a los pulmones. Sin embargo, se han obtenido algunos resultados paradójicos ya que su inhibición parece agravar la severidad de la PA y la lesión pulmonar asociada (posiblemente porque C5a estimula también la liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-10), lo que

podría sugerir un papel contrarregulador del sistema del complemento o de alguna de sus fracciones en el SRIS producido por la PA (Saluja y Steer, 1999).

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

1.4.2. Afectación pulmonar en la pancreatitis aguda.

A partir de los años 60, las mejoras en el tratamiento de la enfermedad permitieron observar una alta incidencia de afectación pulmonar en detrimento de la mortalidad por efecto del shock hipovolémico y la insuficiencia renal. De hecho, el pulmón es el órgano más afectado en el transcurso de la PA y el 60% de la mortalidad durante la primera semana de la enfermedad está asociada a la insuficiencia respiratoria (Rubinfeld y cols., 2005; Andersson y cols., 2010). Se pueden distinguir dos situaciones clínicas o patrones evolutivos de afectación pulmonar secundaria a la PA: daño agudo pulmonar (DAP) y su forma severa, el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA).

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

Analíticamente, se puede apreciar un aumento en la diferencia de pO_2 alveolar-arterial, que conduce a una importante alteración en el intercambio gaseoso (Salomone y cols., 2002).

Morfológicamente, se pueden diferenciar tres grados de afectación pulmonar en fallecidos por insuficiencia respiratoria secundaria a la pancreatitis aguda. El primer grado, que corresponde entre el primer y séptimo día de inicio de la pancreatitis, se caracteriza por edema intersticial e intraalveolar, dilatación de los vasos linfáticos, vasodilatación capilar y reclutamiento y adhesión de leucocitos (Robertson y cols., 1988; Neumann y cols., 1999). Además, se observa la presencia de microtrombos hialinos en los capilares y hemorragias intraalveolares a partir del tercer día. En el segundo grado, entre

el día octavo y decimocuarto, es típica la formación de membranas hialinas y la proliferación de neumocitos. En el último grado, a partir del decimoquinto día, las membranas hialinas se han organizado en tejido fibroso, apareciendo fibrosis intersticial (Pastor y cols., 2003). Además, el epitelio alveolar descamado sufre un proceso de degeneración grasa (Pastor y cols., 2003).

Existe una gran variedad de mecanismos que relacionan el síndrome respiratorio agudo con la PA, reclutamiento de neutrófilos, fenómenos de adhesión y activación leucocitaria, activación de vías de transducción como la de la tirosín quinasa y NF- κ B y expresión de gran variedad de genes inflamatorios. Estos mecanismos son activados por mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de activación plaquetario (PAF), selectinas y moléculas de adhesión, sistema del complemento C5a, neuropéptido P, y quimioquinas como MCP-1 (Browne y cols., 2006). Además, estos mediadores son capaces de liberar especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, con efectos deletéreos sobre las funciones endoteliales y epiteliales pulmonares (Bhatia y Mochhala, 2004).

En los modelos experimentales que caracterizan la histopatología de la lesión pulmonar asociada a la PA, se ha comprobado que tras la inducción de la PA se produce una importante activación de subpoblaciones de macrófagos alveolares (Gea-Sorlí y cols., 2011). A continuación, se observan marcadas alteraciones de las células endoteliales, edema intersticial y engrosamiento de la membrana alveolo-capilar. Finalmente, se produce la destrucción hemorrágica de los alveolos y la pérdida completa de la arquitectura alveolar. Estos cambios morfológicos, que suponen el aumento de la permeabilidad vascular, se traducen funcionalmente como la interferencia en el intercambio gaseoso y producen la alteración de la relación ventilación-perfusión, dando lugar a hipoxemia (Feddersen y cols., 1991; Willemer y cols., 1991).

El DAP asociado a la pancreatitis también está relacionado con la presencia de enzimas digestivas, en particular con la fosfolipasa A₂ (PLA₂). La instilación a nivel pulmonar de PLA₂ produce una serie de cambios caracterizados por edema alveolar, acúmulo de células inflamatorias, alteración del intercambio gaseoso y alta mortalidad (Edelson y cols., 1991). Clínicamente se ha relacionado la concentración de la PLA₂ con la severidad de la PA (Hietaranta y cols., 1999)..

1.4.2.1. Edema pulmonar y Factor Inducible por Hipoxia 1 alfa (HIF-1 α).

El edema pulmonar no cardiogénico es un trastorno agudo producido por el acúmulo de líquido en el intersticio del pulmón y en los alveolos. Es una complicación secundaria a la PA, y surge como consecuencia del síndrome de

distrés respiratorio agudo (SDRA) producido por un aumento de la permeabilidad capilar. La agresión a la pared capilar responsable del aumento de su permeabilidad, y también a las células epiteliales alveolares, es obra de mediadores de la inflamación como TNF- α , IL-6, IL-8 y fragmentos del complemento activado (Fagan y cols., 2001). Junto a estos mediadores de la inflamación, la presencia de las especies reactivas del oxígeno pueden incrementar el daño a la barrera celular endotelial (Moldovan y cols., 2006). Entre las diferentes manifestaciones que se producen en el edema pulmonar, destacan la disnea, tos, estertores y fundamentalmente, hipoxia aguda.

La respuesta a un estado de hipoxia aguda requiere un alto nivel de coordinación. El mecanismo de adaptación incluye desde variaciones en la expresión enzimática, que adaptan la producción de energía a una menor disponibilidad de oxígeno, hasta la puesta en marcha de fenómenos de autoeliminación de la célula ante la imposibilidad de sobrevivir en circunstancias adversas extremas. Todos los organismos, desde las bacterias hasta los humanos, poseen mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno, que son esenciales para la producción energética y por tanto para la supervivencia. En los mamíferos superiores, la respuesta a la hipoxia es compleja, e incluye, entre otras, variaciones de la función respiratoria y hemodinámica, del metabolismo y de la función renal. Estas adaptaciones se manifiestan en cambios hormonales, de mediadores y de actividad enzimática, e implican variaciones en la expresión de una serie de genes importantes en la adaptación de las células a las condiciones de baja concentración de oxígeno (Sonna y cols., 2003). Numerosos factores de transcripción están envueltos en la respuesta fisiológica a la hipoxia, destacando entre ellos el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), responsable de la homeostasis del oxígeno (Semenza, 2004).

HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades (HIF-1 α y HIF-1 β) con pesos moleculares aparentes de 120-130 kD y 91-94 kD, respectivamente. Ambas subunidades comparten cierta homología en sus extremos N-terminales, involucrados en la dimerización y en la unión al ADN. La translocación al núcleo de HIF-1 α y la heterodimerización con HIF-1 β son necesarias para la unión de HIF-1 a los lugares de unión de HIF-1 (HBSs) y su consiguiente transactivación. De manera general, el ARNm de ambas subunidades se expresa constitutivamente bajo cualquier condición. Sin embargo, la proteína de HIF-1 α sólo es detectable en hipoxia. En presencia de oxígeno, HIF-1 α sufre modificaciones post-traduccionales por parte de hidroxilasas, las cuales hidroxilan residuos de prolina 402/564 y de asparagina 803. Estas modificaciones permiten la unión de la proteína VHL (von Hippel Lindau) a los sitios hidroxilados de HIF-1 α , provocando así su ubiquitinación y posterior degradación. En ausencia de oxígeno, HIF-1 α es fosforilado y

translocado al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 β y se acopla a su coactivador CBP/p300, permitiendo la transactivación e inducción de genes (Semenza y Wang, 1992).

La regulación de HIF-1 se atribuye fundamentalmente a las especies reactivas de oxígeno, destacando el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Esta regulación se ejerce de dos maneras distintas. En un caso, la enzima NADPH oxidasa es la responsable de la producción de ERO, que en condiciones de normoxia inducen la degradación de HIF-1 α . Una segunda situación señala que la producción de ERO en la mitocondria, en condiciones de hipoxia, induce la estabilización de HIF-1 α en el citosol (Hu y cols., 2013).

Los genes transcritos activados por HIF-1 se pueden clasificar según la función celular que vayan a desempeñar:

- Angiogénesis: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR).
- Metabolismo: transportador de glucosa 1 (GLUT-1), hexoquinasa-2, enolasa-1 y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH).
- Función vascular: óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), endotelina-1 (ET-1) y hemo oxigenasa 1 (HO-1).
- Eritropoyesis: Eritropoyetina (EPO).
- Motilidad: Factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α).
- Metabolismo del hierro: Transferrina.

En conclusión, debido a las funciones de HIF-1, y a su implicación en la respuesta hipóxica asociada al edema de pulmón, es probable su participación en el desarrollo del fallo pulmonar secundario a la pancreatitis aguda grave.

1.5. Vías de señalización intracelular en la pancreatitis aguda.

Para poder sobrevivir, la célula necesita una regulación de sus genes de manera correcta. Las vías de transducción de la señalización intracelular son de enorme importancia para la adecuada regulación génica.

La alteración de la expresión génica es la base de la patogenia de multitud de enfermedades inflamatorias tales como la pancreatitis, la artritis reumatoide, la hepatitis, la psoriasis y la enfermedad inflamatoria intestinal (Hommes y cols., 2002). Estos mecanismos son fundamentales en el inicio de la respuesta inflamatoria y los productos formados por la inducción de genes inflamatorios, entre los que se incluyen citoquinas, quimioquinas y moléculas

de adhesión, actúan como reclutadores de células inmunocompetentes de la circulación al foco afectado, provocando un mayor daño inflamatorio.

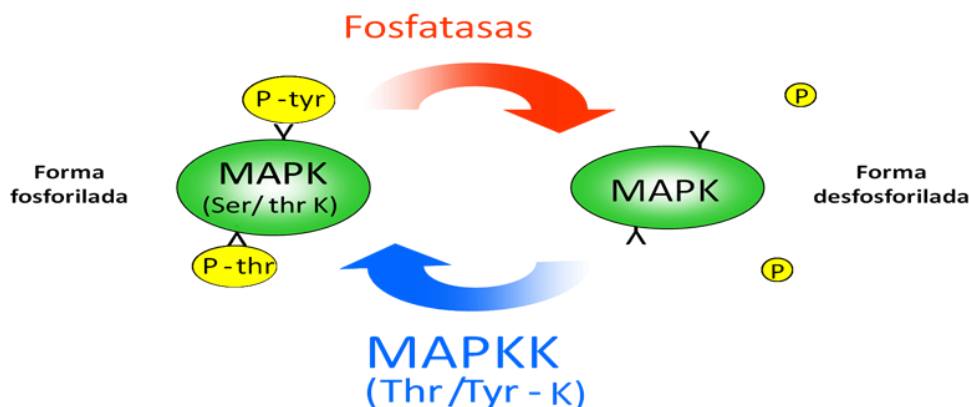
En células eucariotas, la fosforilación de factores proteicos intracelulares, seguida de transcripción génica específica, es un mecanismo universal de funcionamiento de estas señales de transducción. Además, los elementos más importantes de esta señalización son comunes tanto en humanos como en plantas o en hongos.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) 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 (Kyriakis y Avruch, 2001). El hecho de que las MAPKs 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 MAPKs 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.

La activación de las MAPK por fosforilación a través de las MAPKs quinasas (MAPKKs) es reversible y es frenada por la acción de las fosfatasas (Fig. 4). Por la regulación que las MAPK ejercen sobre la expresión génica en la respuesta inmune, las fosfatasas, presentan un papel muy importante en la regulación negativa de la respuesta celular (Hunter, 1995). Se conocen alrededor de 518 proteínas quinasas, pero sólo 140 fosfatasas (Arena y cols., 2005). Sin embargo, la desfosforilación está mucho más activa que la fosforilación en condiciones normales.

Figura 4.- Regulación de las MAP quinasas.



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

1.5.1. Proteín Serín/Treonín Fosfatasas (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. 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).

1.5.1.1. 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). 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).

1.5.1.2. 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.

La PP2A presenta propiedades antiapoptóticas (Lires-Dean 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). 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 Ca^{2+} /calmodulina dependiente (CaMKII) regula las bombas de $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Imig y cols., 2008). También se ha publicado que la PP2A podría estar involucrada en el aumento de la producción de óxido nítrico (NO) en neuronas hipotalámicas, producido por activación de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) inducida por un aumento del Ca^{2+} y por la desfosforilación de la propia nNOS (Xu y Krukoff, 2007).

1.5.2. Proteín Tirosín Fosfatasa (PTPs).

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 que llevan a cabo las proteínas tirosín quinasa, PTKs.

Las ERO actúan como segundos mensajeros en muchos procesos celulares como las cascadas de MAPKs, 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). Se ha descrito la presencia de PTPs de membrana y citoplasmáticas.

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).

1.5.3. Fosfatasa y pancreatitis aguda.

El papel que juegan las fosfatasa en la pancreatitis es realmente complejo. La estimulación de las MAPKs fosfatasa (MKPs) y de las PTPs, SHP-1 y SHP-2 ocurre tempranamente en el transcurso de la PA (Höfken y cols., 2000). Por otro lado, 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). El tratamiento con pentoxifilina en las fases tempranas de la enfermedad, previene la pérdida de actividad PP2A pancreática y como

consecuencia inhibe la función de la histona acetiltransferasa en la expresión de genes pro-inflamatorios (Escobar y cols., 2012b).

Sin embargo, recientemente se ha relacionado la activación mediante Ca^{2+} de la proteína fosfatasa PP2B o calcineurina, debido a la exposición a sales biliares, como responsable del daño pancreático inicial en la pancreatitis aguda de origen biliar (Muili y cols., 2013).

2. OBESIDAD.

2.1. Definición.

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial que se caracteriza por un acúmulo excesivo de grasa o por la hipertrofia general del tejido adiposo. También se utiliza el sinónimo de sobrepeso, ya que la cuantificación de este último se puede relacionar fácilmente con los riesgos atribuidos a la obesidad y su medida no supone un coste tan elevado como la medición directa de la grasa corporal (tabla 3). Se puede considerar la obesidad como una consecuencia de la interacción de las fuerzas ambientales con el sustrato energético del individuo, concretamente con unos genes de susceptibilidad (Mathes y cols., 2011). Esos genes exageran el depósito de grasa cuando se restringe el aporte de alimentos, y aumentan el riesgo de obesidad cuando abunda el alimento y disminuye el consumo de energía.

El sobrepeso se puede definir utilizando las tablas de estatura y peso, calculando el porcentaje de sobrepeso o el peso relativo (cociente entre el peso real y el deseable). Sin embargo, la fórmula que más se utiliza para relacionar la estatura y el peso es el índice de masa corporal (IMC): $\text{peso}/(\text{estatura})^2$, con el peso expresado en kg y la estatura en metros. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como peso saludable un IMC de 20 a 25 kg/m², el sobrepeso se define como un IMC superior a 25 kg/m², y la obesidad se caracteriza cuando el IMC es igual o superior a 30 kg/m². También se considera signo de obesidad un perímetro abdominal aumentado en hombres mayor o igual a 102 cm y en mujeres mayor o igual a 88 cm.

La grasa corporal y su distribución varían según el sexo, edad, grado de ejercicio físico e influencia de algunos fármacos. Tanto en el hombre como en la mujer, la grasa corporal aumenta con la edad. En los hombres jóvenes y delgados, la grasa corporal representa menos del 20% y puede aumentar a más del 25% con la edad. En mujeres jóvenes y delgadas, el porcentaje es del 30%, aumentando hasta el 35% en mujeres mayores. A cualquier edad después de la pubertad, las mujeres tienen más grasa que los hombres.

Tabla 3.- Métodos para calcular la grasa corporal.

Método	Coste	Facilidad de uso	Exactitud	Sirve para medir grasa
Estatura y peso	\$	Fácil	Elevada	No
Pliegues cutáneos	\$	Fácil	Baja	Sí
Perímetros	\$	Fácil	Moderada	Sí
Ecografía	\$\$	Moderada	Moderada	Sí
Densidad por inmersión	\$	Moderada	Elevada	No
Densidad por pletismografía	\$\$\$	Difícil	Elevada	No
Agua pesada titulada	\$\$	Moderada	Elevada	No
Agua pesada deuterada	\$\$\$	Moderada	Elevada	No
Isótopo de potasio (⁴⁰ K)	\$\$\$\$	Difícil	Elevada	No
Conductividad eléctrica	\$\$\$	Moderada	Elevada	No
Impedancia bioeléctrica	\$\$	Fácil	Elevada	No
Gas liposoluble	\$\$	Difícil	Elevada	No
Absorciometría	\$\$\$	Fácil	Elevada	No
TAC	\$\$\$\$	Difícil	Elevada	Sí
RMN	\$\$\$\$	Difícil	Elevada	Sí
Activación de neutrones	\$\$\$\$	Difícil	Elevada	No

Nota: \$: bajo coste; \$\$: coste moderado; \$\$\$: coste elevado; \$\$\$\$: coste muy elevado.

La distribución del tejido adiposo en el organismo se refiere a la cantidad relativa de grasa en los compartimentos principales en donde se almacena el tejido adiposo en el cuerpo. Al respecto, la capa de tejido adiposo que se localiza entre la dermis y la aponeurosis y fascia de los músculos y que incluye al tejido mamario, se define como tejido adiposo subcutáneo (TAS), mientras que el que se ubica en el interior del tórax, abdomen y pelvis se denomina tejido adiposo visceral (TAV) (Cinti, 2006). Frecuentemente, los sujetos descritos como obesos pero metabólicamente sanos presentan menos cantidad de TAV que los denominados obesos pero con alteraciones metabólicas. Inversamente, los sujetos eutróficos pero metabólicamente obesos

frecuentemente presentan más TAV que aquellos con similar peso, pero sin alteraciones metabólicas. Tales hallazgos clínicos son explicados por las diferentes actividades intrínsecas de los diferentes depósitos de grasa. El TAV es reconocido como el principal depósito de grasa asociado al aumento en el riesgo de padecer enfermedades metabólicas; ya que se le implica como el tejido que da inicio a la resistencia a la insulina, debido a que un incremento en el flujo de los ácidos grasos libres (AGL), tanto en el sistema portal como en la circulación general, tiene efectos sobre la captación de glucosa a nivel celular y en el metabolismo glucídico intracelular (Doelle, 2004).

La obesidad forma parte del síndrome metabólico, descrito originalmente por la OMS como un cuadro de resistencia a la insulina junto con otras características de la obesidad (Alberti y Zimmet, 1998). Actualmente, se redefine el síndrome metabólico como la conjunción de varios factores de riesgo o enfermedades entre los que se encuentran una circunferencia abdominal elevada (adiposidad central), concentraciones anormales de triglicéridos, colesterol HDL y glucosa e hipertensión (Scarpellini y Tack, 2012). La obesidad es un factor de riesgo conocido para varias enfermedades, particularmente enfermedades cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2, apnea del sueño, ictus, osteoartritis, así como a algunas formas de cáncer, padecimientos dermatológicos y gastrointestinales (Haslam y James, 2005). Por sí misma, es también un factor pronóstico de mortalidad en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos (Segesvärd y cols., 2008).

2.2. Epidemiología y etiología.

La obesidad es una pandemia de extrema relevancia en nuestros días debido a que ocupa el sexto lugar entre los factores de riesgo que contribuyen al gasto global de enfermedades mundiales. En los Estados Unidos, la prevalencia de la obesidad se elevó lentamente después de la Segunda Guerra Mundial y ha aumentado más de un 40% en los últimos veinte años. Actualmente, según la *National Audit Office* de Londres, el número de muertes por año a causa de la obesidad superó el número de 30000 personas en 2001 en el Reino Unido. Esta cifra se eleva a 300000 en los Estados Unidos (Flegal y cols., 2004).

Empleando como criterio el IMC, el número de personas adultas con sobrepeso asciende hasta 1,1 billones, entre los cuales 312 millones pueden considerarse obesos. Si reajustamos los parámetros del IMC, para poder incluir a la población asiática, a un ratio de 23 kg/m², el número de afectados se eleva hasta 1,7 billones. Estos datos equivalen al 20% del total de la población europea y el 31% de la estadounidense. En cuanto a la obesidad infantil, su

prevalencia aumenta alarmantemente al 36% en algunas regiones occidentales (James y cols., 2004).

La etiología de la obesidad es múltiple, e incluye factores como la herencia genética; el comportamiento del sistema endocrino, nervioso y metabólico; y el tipo o estilo de vida. Entre los factores que pueden causar obesidad puede ser atribuido un 30% a los factores genéticos, 40% a los factores no heredables y 30% a los factores sociales (Mazza, 2001), conduciendo a una relación entre factores genéticos y ambientales del 30% y 70% respectivamente.

La herencia genética tiene un papel importante en el desarrollo de la obesidad. El riesgo de sufrir obesidad para un niño es 10 veces superior a lo normal, en parte debido a tendencias metabólicas de acumulación de grasa, pero también debido a que los hábitos culturales alimentarios y sedentarios contribuyen a repetir los patrones de obesidad de padres a hijos.

La mayoría de los investigadores han concluido que la combinación de un consumo excesivo de nutrientes y el estilo de vida sedentaria son la principal causa de la rápida aceleración de la obesidad en la sociedad occidental en el último cuarto del siglo XX (Bleich y cols., 2007).

El desequilibrio calórico resultante en la obesidad, frecuentemente evoluciona a partir de la combinación de factores genéticos y ambientales. El polimorfismo en varios genes que controlan el apetito, el metabolismo y la integración de adipoquinas, moléculas liberadas por el tejido adiposo, predisponen a la obesidad, pero la condición requiere la disponibilidad de suficientes calorías y posiblemente otros factores para desarrollarse completamente. Varias condiciones genéticas, que tienen como rasgo la obesidad, han sido identificadas (tales como el síndrome de Prader-Willi, el síndrome de Bardet-Biedl, síndrome MOMO, mutaciones en los receptores de leptina y melanocortina), pero mutaciones sencillas en locus sólo han sido encontradas en el 5% de los individuos obesos. La obesidad es probablemente el resultado de interacciones entre múltiples genes donde factores no genéticos también son probablemente importantes.

Un estudio reciente identificó numerosas mutaciones comunes en el gen *fat mass and obesity-associated* (FTO). Los heterocigotos tuvieron un riesgo de obesidad 30 % mayor, mientras que los homocigotos tuvieron un incremento en el riesgo de un 70 % (Frayling y cols., 2007).

Las enfermedades endocrinas supondrían el 3% de las causas etiológicas y encontraríamos patologías como el hipotiroidismo, el síndrome de Cushing,

hipogonadismo, lesiones hipotalámicas o deficiencia de la hormona de crecimiento (Weaver, 2008).

Entre las enfermedades mentales que pueden incrementar el riesgo de obesidad son trastornos alimentarios tales como bulimia nerviosa y consumo compulsivo de comida o adicción a los alimentos.

2.3. Fisiopatología.

El aumento de la mortalidad que se asocia a la obesidad se debe fundamentalmente al aumento de riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, elevación de la presión arterial, diabetes *mellitus* tipo 2 y cáncer. Otras enfermedades donde la obesidad está involucrada son aquellas que pueden afectar a la función pulmonar, al sistema endocrino o al aparato digestivo.

2.3.1. Aparato cardiovascular.

A nivel cardiovascular, la obesidad es responsable fundamentalmente de dos patologías de suma importancia en la esperanza y calidad de vida, la aterosclerosis y la hipertensión arterial.

La aterosclerosis es consecuencia de una dislipemia caracterizada por unos valores bajos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y unos valores altos de triglicéridos y de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad pequeñas (sdLDL). Estos cambios incrementan el riesgo de sufrir una enfermedad cardíaca coronaria de tres a seis veces (Toth, 2013). El desequilibrio del perfil lipídico está relacionado con la resistencia a la insulina y el efecto que producen los ácidos grasos *trans*, ingeridos en la dieta, sobre los lípidos plasmáticos. La obesidad también contribuye al proceso aterogénico con un desequilibrio en la liberación de citoquinas. Aumenta los niveles de citoquinas inflamatorias como la leptina, TNF- α , IL-6 o IL-18, y disminuye los valores de citoquinas protectoras como la adiponectina, creando un ambiente pro-inflamatorio (Scarpellini y Tack, 2012)

Además, la aterosclerosis produce una mayor sobrecarga en el corazón, asociándose a un aumento de muerte súbita debido probablemente a la presencia de arritmias cardíacas (Goyal y Sharma, 2013).

El riesgo de hipertensión es cinco veces mayor en las personas obesas que en las no obesas (Wolf y cols., 1997). La relación entre sobrepeso y presión arterial alta es debido a tres causas principalmente, liberación de angiotensinógeno por parte de los adipocitos, aumento de la volemia asociado a un aumento de la masa corporal y aumento de viscosidad de la sangre. El cambio en la viscosidad de la sangre es inducido por la secreción de

profibrinógeno e inhibidor 1 del activador de plasminógeno por los adipocitos (Appel y cols., 1997).

2.3.2. Diabetes *mellitus* tipo 2.

La relación entre obesidad y diabetes tipo 2 es tan cercana que Sims y colaboradores, en 1970, acuñaron el término de “diabesidad”. Observaron que jóvenes, sin antecedentes familiares de diabetes, desarrollaban la enfermedad cuando su IMC superaba los 28 kg/m², viéndose un aumento de las concentraciones de triglicéridos y glucosa y la aparición de resistencia a la glucosa. Alrededor del 90% de individuos que desarrollan la diabetes tipo 2 tienen un IMC superior a 23 kg/m² (Stevens y cols., 2001).

La resistencia a la insulina es una alteración genética o adquirida que se caracteriza por una inadecuada captación tisular de la glucosa dependiente de insulina, fundamentalmente en hígado, músculo y tejido adiposo (Reaven, 1995). Los mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina abarcan diversas y complejas alteraciones en la señalización y el transporte de la insulina a través de su transportador GLUT-4, y en la regulación normal de la expresión y síntesis de adipocinas (Kahn y Flier, 2000). Las principales citoquinas involucradas son TNF- α , los ácidos grasos libres, la adiponectina y la leptina (Hotamisligil y cols., 1994; Ruan y cols., 2002). Hasta el momento, la disminución de la fosforilación tirosín quinasa del sustrato del receptor de la insulina (IRS), junto con el aumento de la fosforilación serín quinasa del IRS, es el principal candidato iniciador de la patología (Kahn y Flier, 2000). Esta forma de activación no conduce la señal por la vía de PI3-K, pero produce la activación de fosfatasa de fosfotirosina con retroalimentación negativa sobre el receptor (Gao y cols., 2002). La quinasa inhibidora del NF- κ B es el mediador de TNF- α para esta activación (Gao y cols., 2002). El NF- κ B disminuye la expresión de PPAR- γ y adiponectina, con disminución en sus efectos protectores (Rosen y Spiegelman, 2001). La leptina posee efectos protectores, sin embargo, se cree que existe una forma de resistencia a sus efectos en la obesidad (Münzberg y cols., 2004). Los ácidos grasos libres son probables mediadores sistémicos de la acción de TNF- α porque producen resistencia hepática a la insulina y alteraciones en el metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono que desembocan en mayor resistencia a la insulina (Méndez-Sánchez y cols., 2005).

2.3.3. Cáncer.

La incidencia del cáncer endometrial y del cáncer de mama posmenopáusico en la mujer, del cáncer de próstata en el hombre y del cáncer colorrectal, de riñón y de esófago en ambos sexos está relacionada con el

grado de obesidad. Los mecanismos subyacentes que originan el proceso canceroso son difíciles de definir. El reflujo gastroesofágico, debido al volumen abdominal, contribuye al cáncer esofágico, y el cáncer de colon está relacionado con el hiperinsulinismo. El cáncer de mama parece estar vinculado a los estrógenos libres en las mujeres obesas posmenopaúsicas, causados por la conversión periférica de las hormonas sexuales en el tejido adiposo por la aromatasa. Estos cambios también pueden explicar la propensión a padecer el cáncer endometrial y pueden ser relevantes para establecer una relación entre sobrepeso y cáncer de próstata (Ambeba y Linkov, 2011; Bardou y cols., 2013; Behrens y Leitzmann, 2013; Estores y Velanovich, 2013; Parsons y cols., 2013)

El exceso en la concentración de estrógenos también interfiere en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario, creando una función reproductiva anormal y una producción irregular de ciclos anovulatorios (Ambeba y Linkov, 2011).

2.4. Obesidad e inflamación.

La obesidad es una patología que se acompaña frecuentemente de un cierto grado de inflamación, denominada inflamación crónica de baja intensidad (Medzhitov, 2008). Es común la presencia de macrófagos infiltrados en el tejido adiposo. La infiltración podría deberse a la muerte de los adipocitos hipertrofiados y/o a una hipersecreción por parte del tejido adiposo de citoquinas pro-inflamatorias, como la proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP-1). Los macrófagos representan cerca del 7% del total de las células presentes en el tejido adiposo, el aumento de peso inducido por la dieta genera una infiltración de macrófagos que contribuye con más del 60% de las células halladas en ese tejido. Este tipo de leucocito sería una importante fuente de factores de inflamación en el tejido adiposo, y daría lugar a parte de los mecanismos fisiopatológicos que permiten el establecimiento de la resistencia a la insulina y la diabetes *mellitus* tipo 2 (Weisberg y cols., 2003).

Adicionalmente, es posible que el deterioro del endotelio, debido al daño oxidativo resultante de un ambiente lipolítico, juegue un papel importante en el reclutamiento de los macrófagos, similar al observado en la aterosclerosis (Wellen y Hotamisligil, 2003). Al respecto, Strissel sugiere que la muerte de los adipocitos, la cual está relacionada con la hipoxia que tiene lugar cuando el tejido adiposo se expande en breve tiempo, recluta a los macrófagos para remodelar este tejido, eliminando las células muertas y retirando su contenido lipídico potencialmente citotóxico (Strissel y cols., 2007). Se ha demostrado que un factor que participa activamente en el desarrollo de inflamación asociada a la obesidad es la hipoxia, con un importante papel en la alteración de la

secreción de adipocinas, en el aumento en la expresión de genes pro-inflamatorios y en la muerte de los adipocitos (Surmi y Hasty, 2008).

La obesidad debida al exceso de grasa, y en concreto, el acúmulo a nivel visceral, ocasiona que el tejido adiposo secrete cantidades más elevadas de adipocinas, creando un "ambiente inflamatorio" con aumento de las concentraciones de TNF- α , IL-6, resistina, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), leptina, fibrinógeno y componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Redinger, 2008). Algunas de estas adipocinas, sobre todo la leptina, activan a las células endoteliales y ayudan a la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo, responsables de la liberación de moléculas pro-inflamatorias, entre ellas el TNF- α , perpetuando el estado de inflamación descrito en la obesidad.

En los últimos años ha tomado importancia la existencia de unos neuropéptidos llamados orexinas, relacionados con el remodelado del tejido adiposo y con la lipólisis. Actualmente, se está estudiando la relación entre la obesidad y estos neuropéptidos, y concretamente el papel que desempeña la leptina en su regulación (Perez-Leighton y cols., 2013).

2.5. Obesidad y pancreatitis aguda.

En la últimas décadas, diversos estudios clínicos han demostrado que pacientes que padecían pancreatitis aguda acompañada de obesidad han sufrido mayores complicaciones sistémicas (Martínez y cols., 1998; Sempere y cols., 2008; Ammann y cols., 2010) y un aumento de los casos de pancreatitis aguda leve (Johnson y cols., 2004). Por esto, se afirma que la obesidad constituye un factor de riesgo para el desarrollo de complicaciones locales y sistémicas en pancreatitis aguda (Martínez y cols., 2004). Dos metaanálisis confirman que la asociación entre pancreatitis aguda y obesidad aumenta la morbilidad y mortalidad de la patología (Martínez y cols., 2006; Chen y cols., 2012). Recientemente, Sadr-Azodi y colaboradores han observado que no hay relación entre el IMC y riesgo de PA, pero sí que el tejido adiposo abdominal es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la enfermedad (Sadr-Azodi y cols., 2013).

En la pancreatitis aguda necrótica experimental inducida por taurocolato sódico, se ha observado una menor supervivencia en ratas obesas por manipulación genética en comparación con ratas control (Segesvärd y cols., 2001).

En otro estudio, mediante inducción de PA experimental por administración intraperitoneal de IL-12 e IL-18 en ratones, se concluyó que los

animales obesos por manipulación genética desarrollaban una mayor severidad en la pancreatitis aguda (Senello y cols., 2008).

In vitro, la presencia de resistina, adiposquina aumentada en condiciones de obesidad, aumenta la citotoxicidad en células acinares AR42J mediante la activación de TNF- α e IL-6, vía NF- κ B (Jiang y cols., 2013).

El mecanismo por el cual la obesidad agrava la pancreatitis aguda continúa siendo desconocido. No obstante, se propone que las alteraciones del sistema inmune en los pacientes obesos pueden estar detrás de este fenómeno (Papachristou y cols., 2008). Otro factor implicado puede ser la disminución de la concentración de adiponectina, adiposquina protectora, relacionada con la obesidad (Araki y cols., 2008). La lipotoxicidad derivada de la presencia de ácidos grasos insaturados también participa en el desarrollo del fallo multiorgánico asociado a la PA (Navina y cols., 2011).

En resumen, la obesidad se caracteriza por un grado de inflamación crónica en circunstancias normales. En estas condiciones, el tejido adiposo libera concentraciones altas de leptina, resistina, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β , ácidos grasos libres, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) y proteína C reactiva (CRP), sugiriendo la participación activa del este tejido en el desarrollo de la patología. Cuando los pacientes obesos desarrollan la PA, este estado pro-inflamatorio amplifica la respuesta inflamatoria de la enfermedad, contribuyendo a la instauración del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y como consecuencia a la aparición del fallo multiorgánico.

3. ESTRÉS OXIDATIVO.

3.1. Concepto de radical libre.

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

Estas moléculas o átomos tremendamente reactivos se encuentran implicados en el inicio y desarrollo de numerosas enfermedades (Halliwell, 2011). Tras la evidencia del papel patológico de estos compuestos, se han abierto numerosas vías de investigación con el fin de modular o paliar sus efectos deletéreos. En el medio biológico, los radicales libres más frecuentes son compuestos oxigenados y se les llaman especies reactivas de oxígeno. La vida, al desarrollarse en presencia de oxígeno, ha convivido con estas ERO que se han mostrado responsables del daño oxidativo a macromoléculas biológicas como el ADN, lípidos, glúcidos y proteínas (Lambeth, 2007). Multitud de patologías sin nexo de unión se han visto relacionadas por la presencia de estas ERO, e incluso están presentes en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Austin y St-Pierre, 2012) o el ejercicio físico (Sastre y cols., 1992; Nikolaidis y cols., 2012). De cualquier forma, en muchas de estas patologías y procesos fisiológicos se desconoce todavía si son causa o consecuencia. En general, cualquier agresión a un tejido puede causar ruptura celular y liberación del contenido intracelular en el área que rodea la zona lesionada. Esto incluye a los metales de transición, capaces de generar pequeñas cantidades de radicales libres que al superar la capacidad de eliminación pueden agravar un proceso patológico (Del Maestro y cols., 1980; Bencini y cols., 2010).

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

3.2. Clases de radicales libres.

Existen muchas clases de radicales libres, tanto dentro de las ERO como de las ERN. Entre los más importantes podemos destacar los siguientes: el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), poco reactivo pero potencialmente tóxico por los intermediarios que puede producir; el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que, sin ser un radical libre, puede atravesar las membranas causando daño oxidativo

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

3.3. Génesis de las especies reactivas de oxígeno.

Los radicales libres de oxígeno pueden producirse tanto de forma endógena como proceder de fuentes exógenas (Freeman y Crapo, 1982; Baeuerle y Henkel, 1994). Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies de formación endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres que no son producidos por él mismo. En la dieta son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante, además son fuente de radicales libres el humo del tabaco, la polución ambiental, el ozono, etc. (Ames, 1993; Pryor y cols., 1995; Rock y cols., 1996). En cambio, algunas especies reactivas de oxígeno surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos. Sin embargo, otras especies activadas de oxígeno se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (Halliwell, 1991). Podemos por tanto distinguir las fuentes exógenas de génesis de especies reactivas de oxígeno de las fuentes endógenas.

Entre las principales fuentes endógenas involucradas en la formación de las especies reactivas del oxígeno se encuentran: la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Srinivasan y cols., 2012); la enzima NADPH oxidasa (Kawahara y cols., 2007), la reacción de Fenton-Haber-Weiss (Haber y Weiss, 1932), la enzima xantina óxidoreductasa (Vergeade y cols., 2012) y los peroxisomas (Fransen y cols., 2012). La hemoglobina extracelular, liberada en situaciones hemolíticas, procesos inflamatorios o por daño tisular también puede considerarse una fuente endógena de producción de ERO (Alayash y cols., 1999).

La producción de ERO, por fuentes exógenas, puede ser debida a la acción de radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) o a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (von Sonntag, 1994). Los factores ambientales tales como contaminantes aéreos fotoquímicos, la hiperoxia, los pesticidas, el humo del tabaco, los solventes, los anestésicos y los hidrocarburos aromáticos pueden ser otras fuentes de ERO.

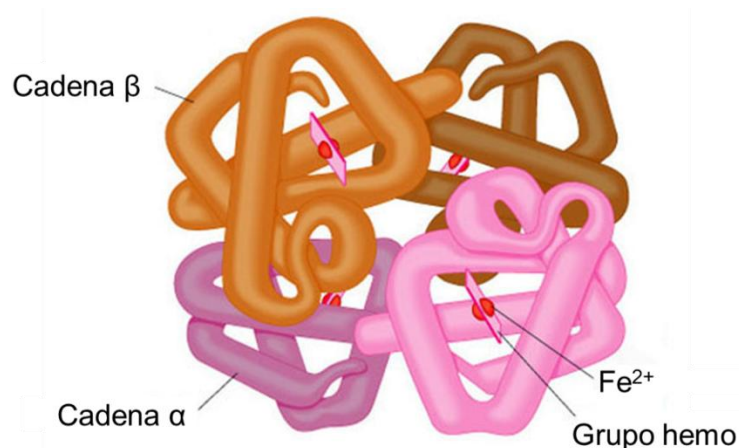
3.3.1. Hemoglobina.

La hemoglobina es una heteroproteína con una masa molecular de 64.000 kD y que está presente mayoritariamente en los glóbulos rojos de la sangre. Sus funciones consisten en transportar el oxígeno, disolver el dióxido de carbono y también participar en la regulación de pH de la sangre.

Una molécula de hemoglobina consta de 2 pares de cadenas polipeptídicas, conocidas como globina, y 4 grupos proteicos hemo que contienen cada uno un átomo de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}). Las cadenas peptídicas son iguales 2 a 2 y adoptan una posición helicoidal, de esta forma la hemoglobina adquiere estructura esteroide (Fig. 5). El grupo hemo es el responsable del color rojo de la hemoglobina

La globina tiene 4 cadenas polipeptídicas que se denominan con las letras α , β , γ , δ . Existe una cadena más, la ϵ , que está presente durante los 3 primeros meses de vida. En el ser humano se pueden encontrar diversos tipos de hemoglobina según las cadenas por las cuales esté formada. La hemoglobina A corresponde al 95% de los adultos, compuesta por 2 cadenas α y 2 cadenas β ; la hemoglobina A'; la hemoglobina F (fetal) con mayor afinidad por el oxígeno, sólo presente hasta el cuarto mes de gestación; y la hemoglobina Gower que desaparece casi por completo en el tercer mes de embarazo, cuando empieza a aparecer la hemoglobina fetal.

Figura 5.- Estructura cuaternaria de la hemoglobina.



3.3.1.1. Metabolismo de la hemoglobina.

La bilirrubina es un pigmento de origen biliar y tonalidad amarillenta que surge como resultado de la descomposición de la hemoglobina. Fue descubierta en el siglo XIX por el científico Heiktz.

Es una biomolécula formada tras la rotura de la membrana celular del eritrocito. Se libera la hemoglobina contenida en ella, y es fagocitada por los macrófagos tisulares del organismo, sobre todo los del bazo, hígado y médula ósea.

En la degradación de la hemoglobina, se separan, por un lado, la molécula de globina y, por otro, el grupo hemo. La bilirrubina es un producto de degradación de las proteínas que contienen el grupo hemo.

La hemo oxigenasa degrada el grupo hemo en los macrófagos, abriendo el anillo tetrapirrólico para dar origen a una molécula lineal de 4 anillos pirrólicos llamada biliverdina (Fig. 6), a hierro libre (se oxida el Fe^{2+} a Fe^{3+}) y a monóxido de carbono.

Figura 6.- Degradación del grupo hemo de la hemoglobina.



La biliverdina es reducida por la enzima biliverdina reductasa para dar bilirrubina. Durante las horas o los días siguientes, los macrófagos liberan el hierro de la hemoglobina que será transportado por la transferrina hasta la médula ósea (para formar nuevos hematíes), o almacenado en el hígado y otros tejidos en forma de ferritina para situaciones de necesidad.

La bilirrubina, al ser muy poco soluble en agua, viaja unida a la albúmina sérica (proteína transportadora) por el torrente sanguíneo al hígado, donde se separan. Allí se une al ácido glucurónico, de forma que la bilirrubina se hace

más soluble. La bilirrubina directa comprende a la bilirrubina conjugada con el ácido glucurónico y la bilirrubina indirecta comprende a la que va unida a la albúmina.

Este glucurónido de bilirrubina se secreta activamente en la bilis y se dirige hacia el intestino. Las bacterias intestinales metabolizan esta bilirrubina y la transforman en una serie de pigmentos denominados urobilinógenos. Estos pigmentos son los que le dan a las heces el típico color amarillo marrón. Una parte de estos urobilinógenos, dado que son más solubles en agua, se reabsorben hacia la sangre y son eliminados por los riñones a la orina.

El incremento de la bilirrubina en el torrente sanguíneo hace que este pigmento se acumule en los tejidos con mayor cantidad de fibras elásticas. Los valores normales de bilirrubina en sangre se ubican entre 0,3 y 1 mg/dl. Cuando el nivel supera los 2 mg/dl, la piel y la mucosa se vuelven amarillentas.

3.3.1.2. Actividad peroxidasa de la hemoglobina.

En condiciones normales, la mayor parte de la hemoglobina se encuentra en el interior de los glóbulos rojos, donde es protegida del medio interno por unos eficientes complejos enzimáticos diseñados para evitar la interacción de la hemoglobina con moléculas extracelulares. La concentración de hemoglobina libre o extracelular en circulación es por tanto mínima y controlada por unas proteínas específicas del plasma, llamadas haptoglobinas, y por macrófagos. Sin embargo, en condiciones patológicas puede producirse la liberación de la hemoglobina de los glóbulos rojos mediante hemólisis. En estas circunstancias, la concentración de hemoglobina libre esta aumentada y los mecanismos reguladores son insuficientes para evitar sus efectos tóxicos (Buehler y cols., 2010b).

El causante de la toxicidad de la hemoglobina es el grupo hemo, debida fundamentalmente a la capacidad que tiene de desarrollar una actividad de tipo peroxidasa. En presencia de un ambiente inflamatorio, oxidantes como el H_2O_2 reaccionan con la hemoglobina generando radicales libres. Si estos radicales no son neutralizados pueden causar un grave daño oxidativo en células y órganos. Por otra parte, otra propiedad potencialmente tóxica que tiene la hemoglobina es la habilidad para reaccionar con el óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador que juega un papel crucial en la relajación del músculo liso, en la regulación de la expresión molecular en el endotelio y en la generación y activación de plaquetas (Schaer y cols., 2013).

En resumen, las propiedades oxidativas y vasoactivas descritas anteriormente son las responsables de la toxicidad de la hemoglobina extracelular observada en multitud de enfermedades (Nielsen y cols., 2010).

3.4. Antioxidantes.

Puesto que continuamente la maquinaria celular está produciendo especies reactivas del oxígeno, necesita poseer sistemas de contención de estos pro-oxidantes. Estos mecanismos de defensa son las denominadas sustancias antioxidantes. Halliwell en 1995 definió antioxidante como “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Halliwell y Gutteridge, 1995). Bajo el punto de vista bioquímico los podemos dividir en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

Como antioxidantes enzimáticos encontramos la catalasa, que participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance y cols., 1979); la glutatión peroxidasa que convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos en moléculas inofensivas (Chance y cols., 1979) y la superóxido dismutasa, la cual transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord y cols., 1974; Fridovich, 1978).

3.4.1. Antioxidantes no enzimáticos.

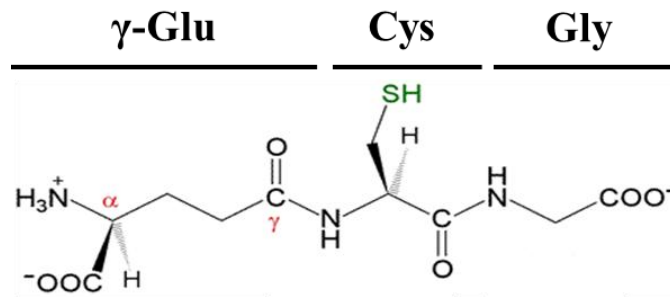
Son aquellas moléculas que reaccionan directamente sin que sea necesaria ninguna intervención enzimática con las especies reactivas o con los productos de reacción de éstas. Sin embargo, en ocasiones pueden participar también en procesos antioxidantes enzimáticos. Entre los antioxidantes no enzimáticos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

3.4.1.1. El glutatión (GSH).

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

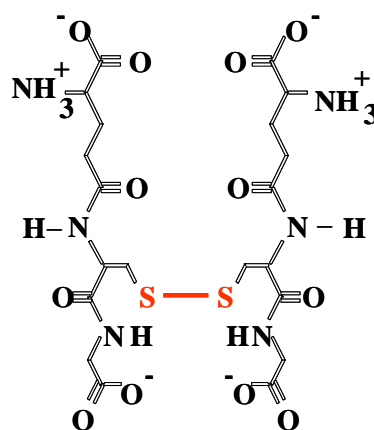
Tiene numerosas e importantes funciones fisiológicas y metabólicas que se derivan de su peculiar estructura (Fig. 7) (Viña y cols., 1990). Presenta un grupo tiol libre (-SH) que corresponde al aminoácido de cisteína, que es el que interviene en las reacciones redox del glutatión. Además, posee un enlace muy particular, el γ -glutamilo, que le hace resistente a la degradación por las peptidasas habituales de la célula. En la actualidad, sólo se conoce una enzima capaz de hidrolizarlo, la γ -glutamil transpeptidasa, que está situada en la membrana celular (Viña y cols., 1992).

Figura 7.- Estructura química del glutatión reducido (GSH).



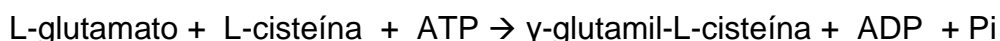
El glutatión se puede encontrar de dos formas, según su estado de óxido-reducción: como GSH o glutatión reducido (Fig. 7), o como GSSG o glutatión oxidado. El GSSG está compuesto por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas (Fig. 8).

Figura 8.- Estructura química del glutatión oxidado (GSSG).



3.4.1.1.1. Síntesis del glutatión y su regulación.

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



El segundo paso de la síntesis de GSH está catalizado por la glutatión sintetasa (GS), que une una glicina a la γ -glutamil cisteína. La enzima glutatión sintetasa se compone de dos subunidades idénticas y no está sujeta a inhibición por retroalimentación negativa por el GSH (Oppenheimer y cols., 1979). En el riñón de la rata se glicosila pero el papel de la glicosilación de la enzima en la regulación de su actividad es desconocido (Oppenheimer y cols., 1979; Lu, 1999).

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

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

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

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

3.4.1.1.3. Vía de la transulfuración.

La disponibilidad de L-cisteína es el factor limitante para la síntesis de glutatión en condiciones fisiológicas. La cisteína proviene de la dieta, de la proteólisis o alternativamente es sintetizada a partir de metionina por medio de la vía de transulfuración (Fig. 9) (Viña y cols., 1996). El hecho que el ayuno induce una caída de los niveles de GSH del 50% en ratas control subraya la importancia del estatus nutricional en la síntesis de GSH. De hecho, el ayuno durante 48 horas produce una marcada depleción de glutatión en el hígado y los niveles se restauran al alimentarse normalmente (Tateishi y cols., 1983). Además, los niveles hepáticos de glutatión se relacionan íntimamente con el contenido de cisteína y/o de cistina de la dieta.

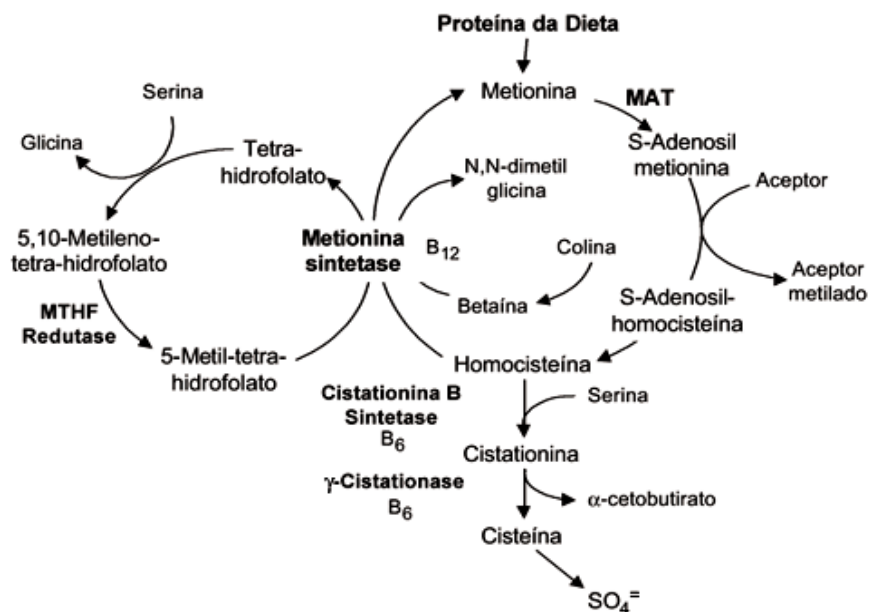
La cisteína entra en la célula utilizando transportadores específicos para aminoácidos neutros (Bannai, 1984). En hepatocitos se transporta principalmente por el sistema ASC sodio dependiente, y también está sujeto a inhibición cis y estimulación trans por los otros sustratos de este sistema (Kilberg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

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

- 1- Activación de la metionina a s-adenosil metionina
- 2- Desmetilación
- 3- Eliminación de la fracción s-adenosil para formar homocisteína.
- 4- Formación de cistationina de la homocisteína y serina
- 5- Unión de la cistationina para dar cisteína y α -ketobutirato.

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

Figura 9.- Vía de la transulfuración y metilación.



3.5. Estrés oxidativo.

3.5.1. Concepto de estrés oxidativo.

En la vida celular, la producción de cierta cantidad de radicales libres es normal e inevitable (Slater, 1984). En general, niveles moderados de radicales actúan como señalizadores para promover la proliferación y supervivencia celular (De Marchi y cols., 2013). Sin embargo, estas especies tan reactivas serían capaces de causar un daño oxidativo si no fuese porque existe una cantidad de mecanismos antioxidantes que evitan dicho daño y mantienen la homeostasis redox. El concepto de estrés oxidativo fue introducido por Sies en 1986, y se define como un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes en favor de las primeras (Sies, 1986). El estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez. En situaciones de estrés oxidativo se produce oxidación de biomoléculas causando daño tisular, dado que la capacidad antioxidante se ha visto desbordada.

La oxidación se produce a nivel de las cuatro principales biomoléculas, lípidos, glúcidos, ácidos nucleicos y proteínas. Los radicales libres atacan a las

biomoléculas y son capaces de oxidarlas causando pérdida de función, acumulación de moléculas oxidadas y mutaciones.

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

3.5.2. Daño oxidativo a lípidos.

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

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

De esta manera, un solo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, principalmente aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonenal, hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Halliwell, 1991; Halliwell, 1994) y productos de la oxidación no enzimática del ácido araquidónico como los isoprostanos (Morrow y cols., 1990).

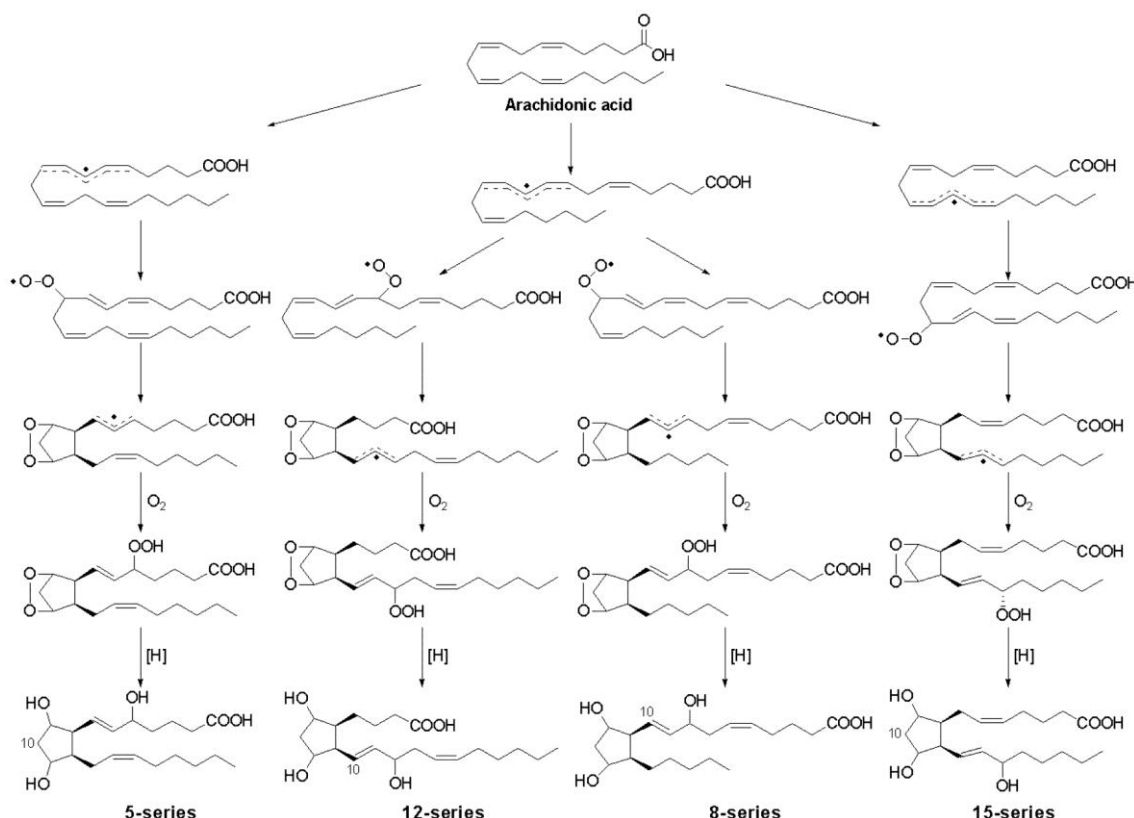
3.5.2.1. F₂-Isoprostanos.

Los isoprostanos son moléculas formadas por la oxidación del ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado ubicuo (Morrow y cols., 1990). Al contrario que las prostaglandinas, formadas por la acción de la enzima

ciclooxigenasa, estas moléculas son originadas por peroxidación independiente de esta enzima (Fig. 10).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la cuantificación de los F₂-isoprostanos es la medida más correcta de valorar el daño oxidativo, tanto *in vitro* como en modelos animales (Famm y Morrow, 2003). Además del estrés oxidativo, están implicados en numerosas enfermedades de origen cardiovascular, pulmonar, renal, hepático y neurológico (Morrow y Roberts, 1997; Praticò y cols., 2001). Aunque la asociación entre aumento de estrés oxidativo y enfermedad no implica necesariamente una conexión, el hecho de que los niveles de isoprostanos estén aumentados tempranamente en asma (Montuschi y cols., 1999), cirrosis hepática (Praticò y cols., 2001) o enfermedad de Alzheimer (Montine y cols., 2002) indica un papel importante en el origen de múltiples y diversas enfermedades.

Figura 10.- Mecanismo de formación de isoprostanos.



Los isoprostanos no son únicamente marcadores de estrés oxidativo, intervienen en numerosos procesos biológicos, planteando una función de mediadores fisiopatológicos de daño oxidativo. La mayoría de los estudios de

las acciones biológicas están centrados en el 15-F_{2t}-isoprostano, un potente vasoconstrictor. Los F₂-isoprostanos reducen la filtración glomerular y el flujo renal sanguíneo debido a sus propiedades vasoactivas (Badr y Abi-Antoun, 2005). En otros lechos vasculares, el 15-F_{2t}-isoprostano también tiene efecto constrictor, como en la arteria pulmonar (Dromparis y Michelakis, 2012), las arterias coronarias (Benndorf y cols., 2008), las arteriolas cerebrales (Hou y cols., 2000), los vasos de la retina (Brantley y cols., 2012) y la vena porta (La Mura y cols., 2011). Los F₂-isoprostanos causan contracción del músculo esquelético bronquial humano *in vitro* (Beauchamp y cols., 2001) e inducen obstrucción del flujo aéreo y exudación del plasma en cerdos *in vivo* (Okazawa y cols., 1997).

Los isoprostanos desarrollan importantes actividades *in vitro* que pueden ser relevantes en la fisiopatología de la aterosclerosis. Participan en promover la activación plaquetaria e inducen mitogénesis en células musculares esqueléticas. Además, su síntesis está aumentada durante la oxidación de las LDL *in vitro* (Cracowski, 2004; Davies y Roberts, 2011).

La acción vasoconstrictora de los isoprostanos puede estar mediada por la activación de los receptores de tromboxano A₂ (Takahashi y cols., 1992, Delannoy y cols., 2010).

3.5.2.2. Malondialdehído (MDA).

El malondialdehído (MDA) es el producto de peroxidación lipídica más estudiado. Desde 1960 numerosos métodos de determinación han sido desarrollados para evaluar esta molécula y por tanto cuantificar el grado de estrés oxidativo tanto *in vivo* como *in vitro*.

La principal fuente de producción de MDA son los ácidos grasos poliinsaturados con dos o más dobles enlaces entre grupos metilenos. Existen tres hipótesis que explican su formación. La primera está basada en un precursor endoperóxido cíclico similar al formado durante la biosíntesis de las prostaglandinas (Pryor y Stanley, 1975). Las otras dos teorías explican la formación del MDA mediante la síntesis sucesiva de hidroperóxidos y β -eliminación de la cadena de ácidos grasos para dar el correspondiente hidroperoxialdehído (Esterbauer y cols., 1991). El MDA también puede generarse *in vivo* en un proceso enzimático a partir de varias prostaglandinas (Hecker y Ullrich, 1989).

En condiciones fisiológicas, a pH neutro, el MDA se encuentra en forma de anión enolato y posee muy baja reactividad (Esterbauer y cols., 1991). Sin embargo, esta molécula puede reaccionar con las bases de los ácidos nucleicos y formar distintos aductos (Marnett, 1999). El principal producto de

esta reacción es el pirimido-[1,2- α] purin-10(3H)-1 desoxirribosa, abreviadamente, M1G. Este aducto es capaz de ocasionar mutaciones y sustituciones de pares de bases en bacterias y células de mamíferos (Van der Veen y cols., 2003). El MDA también es capaz de crear enlaces con las proteínas, en concreto con las histonas, tanto en condiciones fisiológicas como iónicas (Voitkun y Zhitkovich, 1999). Todas estas actividades potencialmente genotóxicas causarían mutaciones y por último cáncer.

Otro proceso en el que este aldehído está involucrado es en la aterogénesis. Puede reaccionar con aminas primarias del residuo de lisina de la apolipoproteína B100 (Uchida, 2000). Este fenómeno tiene lugar en la capa íntima de las arterias, fuera del alcance de los mecanismos antioxidantes plasmáticos, formando las bases de Schiff e incrementando la carga negativa de la partícula LDL. Una vez se ha formado la modificación estructural de la LDL nativa, ésta no es reconocida por los receptores apo B/E de las células hepáticas y de los tejidos periféricos. En cambio, sí es detectada y reconocida por un grupo de receptores denominados genéricamente receptor *scavenger* ("basurero"), al que inicialmente se atribuía un rol protector por su capacidad de captar el exceso de LDL circulante. La evidencia actual, por contra, indica que la inducción de su actividad es pro-aterogénica. En relación con las enfermedades cardiovasculares, también es capaz de interactuar con el colágeno contribuyendo al empeoramiento del proceso aterogénico (Slatter y cols., 2000).

En el contexto de la pancreatitis aguda, el MDA ha sido una molécula utilizada en numerosas ocasiones para determinar el daño oxidativo lipídico asociado al desarrollo de la enfermedad (Dabrowski y cols., 1988; Luan y cols., 2013). Recientemente, se ha comprobado que altos niveles de MDA en suero en estadios tempranos están asociados con la severidad de la PA (Hernández y cols., 2011). Sin embargo, actualmente se desconoce la relación existente entre el MDA y la patogénesis y/o fisiopatología de la pancreatitis aguda.

En conclusión, el MDA, como se ha comentado anteriormente con los isoprostanos, no es sólo un marcador de peroxidación lipídica. Debido a su capacidad mutagénica y a su participación en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, su determinación y análisis es importante a la hora de valorar la patogénesis del estrés oxidativo y su participación en numerosas enfermedades, entre ellas la pancreatitis aguda.

3.6. Estrés oxidativo y pancreatitis aguda.

La búsqueda de un agente desencadenante de la pancreatitis aguda y las semejanzas con otros tipos de lesiones donde el estrés oxidativo tiene un papel importante, estimuló la investigación de la participación de los radicales libres en la PA. A principios de los años ochenta, Hillary Sanfey y sus colaboradores pudieron demostrar que el pretratamiento con agentes antioxidantes disminuía de forma significativa la hiperamilasemia, el edema y el incremento de peso del páncreas, demostrando de forma indirecta la participación de los radicales libres en la pancreatitis aguda (Sanfey y cols., 1984; 1985).

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

Numerosos grupos han estudiado en profundidad el estrés oxidativo, la XO, y otras moléculas pro y antioxidantes, concluyendo que el estrés oxidativo es un factor clave tanto en los procesos iniciales locales de la PA (Sevillano y cols., 2003; Escobar y cols., 2010) como en la posible respuesta inflamatoria sistémica asociada a la enfermedad (Rau y cols., 2000; Que y cols., 2010).

Las demostraciones *in situ* de la formación de radicales libres durante la pancreatitis, en ratas y humanos, fue llevada a cabo por Telek y colaboradores usando el cerio como secuestrador de los radicales libres (Telek y cols., 1999; Telek y cols., 2001).

La fuente de las diferentes ERO difiere según el modelo experimental de PA empleado. En la PA leve, causada por sobreestimulación con ceruleína, los radicales libres parecen estar asociados a la infiltración de neutrófilos activados, mientras que en la PA necrotizante inducida por perfusión retrógrada

de taurocolato sódico, la causa puede ser la conversión de XDH a XO (Closa y cols., 1994).

Tanto en modelos de PA leve, inducida por ceruleína o L-arginina, como en modelos de PA grave, inducida por taurocolato, se ha podido demostrar un descenso precoz de GSH e incluso de cisteína, su aminoácido precursor, que se mantiene y precede a la formación de edema pancreático. Este descenso en los niveles de glutatión supondría, además de la pérdida de la capacidad de defensa antioxidante, una alteración en la integridad del citoesqueleto y en la membrana de las organelas intracelulares, lo que permitiría la prematura activación de las enzimas digestivas en el interior de las células acinares y el consiguiente desarrollo del proceso inflamatorio (Schulz y cols., 1999). Este mecanismo puede ser revertido, disminuyendo el grado de afectación pancreática, cuando los animales de experimentación son pretratados con precursores del GSH como la cisteína o el zinc o son tratados con pentoxifilina (Escobar y cols., 2012a). Sin embargo, en un ensayo clínico en 79 pacientes con PA tratados con una combinación de S-adenosilmetionina y N-acetilcisteína no se consiguieron reproducir estos efectos beneficiosos (Sharer y cols., 1995).

Junto al GSH, otros parámetros de estrés oxidativo suelen estar alterados durante la evolución de la PA, como algunas enzimas antioxidantes, lípidos oxidados, proteínas carboniladas y/o la actividad mieloperoxidasa (MPO), poniendo de manifiesto la relación entre estrés oxidativo y PA (Park y cols., 2003; Winterbourn y cols., 2003; Hernández y cols., 2011). De hecho, la severidad de la enfermedad se correlaciona en multitud de ocasiones con la concentración de estos parámetros (Abu-Zidan y cols., 2000).

Las especies reactivas de nitrógeno (ERN) están relacionadas también con el funcionamiento normal de páncreas y con su fisiopatología. El óxido nítrico participa en la regulación de la secreción normal del páncreas exocrino y endocrino, así como en el flujo sanguíneo pancreático. En procesos inflamatorios como la PA, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) contribuye a la formación de óxido nítrico (NO) en la PA grave (Tanjoh y cols., 2007). Está demostrado que una producción moderada de NO tiene efectos beneficiosos en la PA experimental edematosa, sin embargo, una sobreproducción descontrolada puede ser perjudicial (Ozturk y cols., 2008). La síntesis de NO y la expresión de las distintas isoformas de la óxido nítrico sintasa, en páncreas y pulmón, parece estar diferenciada según la magnitud y la fase de la PA, sugiriendo un papel diferente para cada óxido nítrico sintasa (Ang y cols., 2009).

En los últimos años, se ha descrito un nuevo e importante papel del estrés oxidativo como señalizador celular (D'Autréaux y Toledano, 2007). Un

desbalance redox no sólo es responsable de daño oxidativo, sino que también participa como señalizador intracelular en procesos inflamatorios, particularmente en la regulación de genes pro-inflamatorios (Leung y Chan, 2009). De hecho, las ERO actúan como mediadores inflamatorios a través de la activación, migración y adhesión de leucocitos y también aumentando la expresión de otros mediadores como citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión (Pereda y cols., 2006; Ramnath y cols., 2008). En las células pancreáticas, las ERO inducen la activación de NF- κ B (Algül y cols., 2002). Además, las ERO generadas por la XO durante la PA regulan la expresión de P-selectina, mediador en la infiltración neutrofílica (Folch y cols., 2000a).

En general, la modulación de la señalización intracelular por un desbalance redox es producido por dos mecanismos. Por un lado, especies oxidativas como H_2O_2 y aldehídos α y β -insaturados se consideran directamente como segundos mensajeros en la respuesta inflamatoria (Escobar y cols., 2012b). Por otro lado, el estado redox integra la transducción de la señal celular a través de modificaciones covalentes en sensores redox (Szczesny y cols., 2004). Un ejemplo de estos sensores redox son los grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteína. Estos grupos tiólicos permiten la oxidación transitoria de algunas proteínas capacitándolas para la transmisión de las señales intracelulares. A continuación, mediante la acción de unas enzimas reductoras específicas vuelven a su estado basal.

El H_2O_2 actúa como segundo mensajero en la activación de la NADPH oxidasa y del factor de transcripción NF- κ B (Li y cols., 2009). En la PA experimental, la expresión y actividad de la NADPH oxidasa está aumentada (Chan y Leung, 2007).

Las ERO producidas en la respiración mitocondrial también participan en la señalización-transducción de moléculas relacionadas con la producción de citoquinas pro-inflamatorias, vía dependiente o independiente del inflammasoma (Bulua y cols., 2011; Zhou y cols., 2011). Estas ERO participan en los procesos de apoptosis mediante la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas, jugando un papel importante el calcio en la pérdida de potencial de membrana mitocondrial en las células acinares (Odinokova y cols., 2009).

El estrés oxidativo promueve la activación de vías de fosforilación como las MAPKs a través de la inactivación de proteínas fosfatasa (Lee y Esselman, 2002). Las fosfatasas actúan como dianas moleculares de las ERO debido a que las cisteínas catalíticas son más sensibles a la oxidación reversible que otras cisteínas (Tonks, 2005). Un estrés oxidativo leve causa la oxidación reversible de estas cisteínas formando ácido sulfénico, mientras que un estrés

oxidativo intenso daría lugar a formaciones irreversibles como los ácidos sulfínicos y sulfónicos (Jackson y Denu, 2001).

Por consiguiente, las ERO y particularmente aquellas que proceden de la respiración mitocondrial regulan el balance entre MAPKs y algunas fosfatasa, controlando la respuesta inflamatoria mediante señalización redox (Escobar y cols., 2010; Naik y Dixit, 2011). La activación de estas vías de fosforilación, NF- κ B y otros factores de transcripción promueve cambios en la estructura de cromatina, especialmente en la acetilación de histonas que regulan la expresión de genes inflamatorios. El reclutamiento de la histona acetil transferasa y la inactivación de la histona deacetilasa es un proceso complejo que es modulado por el ambiente redox, siendo la histonas deacetilasas las mayores dianas del estrés oxidativo en este contexto (Escobar y cols., 2012b).

En conclusión, varios mecanismos moleculares están implicados en los efectos locales y sistémicos de la pancreatitis aguda mediante la expresión de genes inflamatorios y a través de la estimulación de la producción de citoquinas pro-inflamatorias. El estrés oxidativo es un modulador clave en la señalización celular y desempeña un papel fundamental en la casacada inflamatoria, sin embargo, su función es mucho más compleja de lo esperado. Actualmente, numerosos estudios están dirigidos para clarificar la interacción entre el estrés oxidativo y la pancreatitis aguda, y también para diseñar estrategias terapéuticas eficaces basadas en el tratamiento con antioxidantes o reguladores redox.

II-OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis ha consistido en analizar la contribución del estrés oxidativo y del tejido adiposo abdominal en la respuesta local y sistémica de la pancreatitis aguda experimental.

Los objetivos concretos han sido los siguientes:

- 1.- Estudiar la posible presencia de hemoglobina extracelular y su actividad peroxidasa asociada en el líquido ascítico y en el plasma durante la pancreatitis aguda experimental inducida por taurocolato sódico.
- 2.- Analizar el origen de la hemoglobina extracelular y su papel en las complicaciones locales y sistémicas de la pancreatitis aguda experimental.
- 3.- Estudiar el estrés oxidativo y el perfil lipídico en la pancreatitis aguda experimental y su repercusión a nivel local y sistémico en la mayor severidad de esta patología asociada a la obesidad.
- 4.- Estudiar los efectos del lavado peritoneal sobre la respuesta local y sistémica de la pancreatitis aguda en ratas control y obesas.

*III-MATERIAL Y
MÉTODOS*

1. MATERIAL.

1.1. Animales de experimentación.

Los animales de experimentación utilizados para la pancreatitis aguda necrótica experimental inducida por taurocolato sódico fueron ratas macho *Wistar* (250 ± 25 g), ratas macho control (*lean*) (308 ± 25 g) y ratas macho obesas (*Zucker*) (*fa/fa*) (433 ± 34 g). Las ratas *Wistar* procedían del animalario de la Facultad de Farmacia. Las ratas *lean* y *Zucker* fueron adquiridas de laboratorios Harlan (Barcelona, España) y Charles River (Barcelona, España). Las ratas *Zucker* se caracterizan por una mutación en el receptor de la leptina, mostrando hiperfagia y otras alteraciones similares que aparecen en el síndrome metabólico humano.

Todos los animales fueron alimentados con una dieta estándar de laboratorio que contenía 590 g de carbohidratos, 30 g de lípidos, y 160 g de proteínas por kilogramo de dieta y agua corriente *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en el estabulario de la Facultad de Farmacia del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE), bajo condiciones de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz /oscuridad (12 /12 h) constantes.

Los animales recibieron cuidado acuerdo con el criterio escrito en “*Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio*” preparado por la Academia Nacional de las Ciencias y publicado por el Instituto Nacional de Salud (NIH publicación 86-23 revisado 1985). El Comité de Investigación de la Facultad de Medicina (Universidad de Valencia, España) aprobó el protocolo de estudio.

La manipulación de los animales y los protocolos de experimentación han sido realizados de acuerdo con las normas de experimentación animal de la Unión Europea (N.E.A.U.E. 1999).

1.2. Aparatos.

- Autoclave.

Marca JP SELECTA (Barcelona, España), modelo AUTESTER-G.

- Autoinyector y detector UV-V para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para el análisis de muestras mediante HPLC se utilizó el autoinyector 235P y el detector UV-visible 156 de GILSON (Middleton, USA).

- Balanzas.

Balanza de precisión SARTORIUS (Gotinga, Alemania), modelo ACCULAB ATILON, con una sensibilidad de ± 0.0001 g. También se ha utilizado una balanza SARTORIUS modelo PT 1200, con una sensibilidad de ± 0.1 g.

- Baño seco digital.

Se utilizó un baño provisto de agitación automática regulable, marca ACCUBLOCK D1100 de LABNET (Edison, USA).

- Bomba de perfusión.

Bomba de perfusión para la correcta perfusión de taurocolato de la marca HARVARD APPARATUS (Massachusetts, USA), modelo Pump 11.

- Captador de imágenes.

Para el revelado de las membranas de nitrocelulosa se empleó el *ChemiDoc MP Imaging System*[®] (Bio-Rad, California, USA).

- Centrífugas.

Para las centrifugaciones se utilizó una centrífuga de la firma HETTICH LAB TECHNOLOGY (Tuttlingen, Alemania), modelo Rotina 420R.

- Cubetas de electroforesis y electrotransferencia

Cubeta de electroforesis de la casa BIO-RAD (California, USA), modelo PROTEAN II xi cell. Para la electrotransferencia en seco, modelo *iBlot*[®] 7-Minute Blotting System de INVITROGEN (Carlsbad, USA).

- Espectrofotómetro.

Se emplearon tres clases de espectrofotómetros, el modelo MULTISKAN SPECTRUM[®] de THERMO SCIENTIFIC (Waltham, USA) para lecturas en placa y el espectrofotómetro BTS-310 de BIOSYSTEMS (Barcelona, España) para lecturas en cubeta. Para la cuantificación de la concentración de ARN se utilizó el espectrofotómetro NANODROOP 2000c[®] de Thermo Scientific (Waltham, USA).

- Fuente de alimentación de electroforesis.
Marca SIGMA-ALDRICH (Missouri, USA), modelo PS 250-2, y marca BIO-RAD (California, USA), modelo 200/2.0 Power Supply.
- Homogeneizador.
Marca HEIDOLPH (Schwabach, Alemania), modelo RZR 2021.
- pHmetro.
El pHmetro empleado es de la marca CRISON (Barcelona, España), modelo pH-meter BASIC 20.
- Sonicador.
Sonicador *Digital SLPe cell disruptor* de la marca BRANSON (Danbury, USA).
- Termociclador.
Modelo *iCycler iQTM5 Multi-Color Real-Time PCR Detection System*, marca BIO-RAD (California, USA),

2. MÉTODOS.

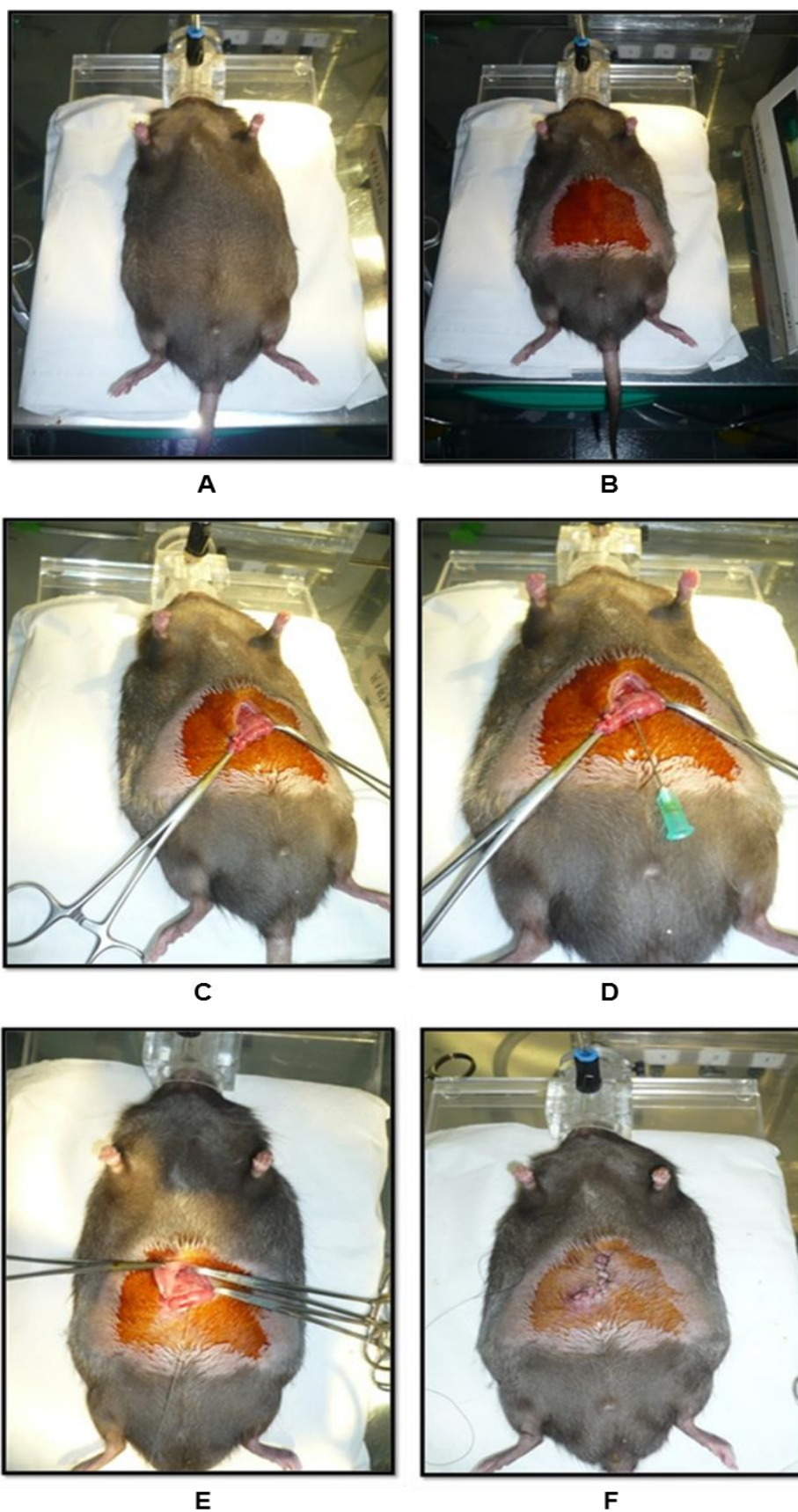
2.1. Modelo experimental de pancreatitis aguda necrótica.

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

La inducción y el mantenimiento de la anestesia fueron realizados con isoflurano (Isoflo[®], ASTfarma, Oudewater, Países Bajos) inhalado al 3% (Fig. 11A). Tras anestesiar al animal, la inducción de la PA se lleva a cabo bajo estrictas medidas de asepsia. En primer lugar, realizamos el rasurado y posterior pincelado de los animales con povidona yodada (Fig. 11B). A continuación, se practica una laparotomía media, se eviscera y localiza el duodeno (Fig. 11C), 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) (Fig. 11D). Después de clampar dicho conducto a su salida del hígado se comienza la perfusión de taurocolato sódico al 3.5% (Sigma, Missouri, USA) (Fig. 11E) utilizando una bomba de perfusión (Harvard Apparatus). 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 (Fig. 11F). A continuación, se muestra una secuencia de imágenes en la que se expone el proceso llevado a cabo.

La perfusión se realizó a un ritmo de 0.1 ml/100 g de peso del animal durante un minuto, en las ratas *Wistar*. En el caso de las ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) se aplicó un flujo constante de 0.3 ml/minuto.

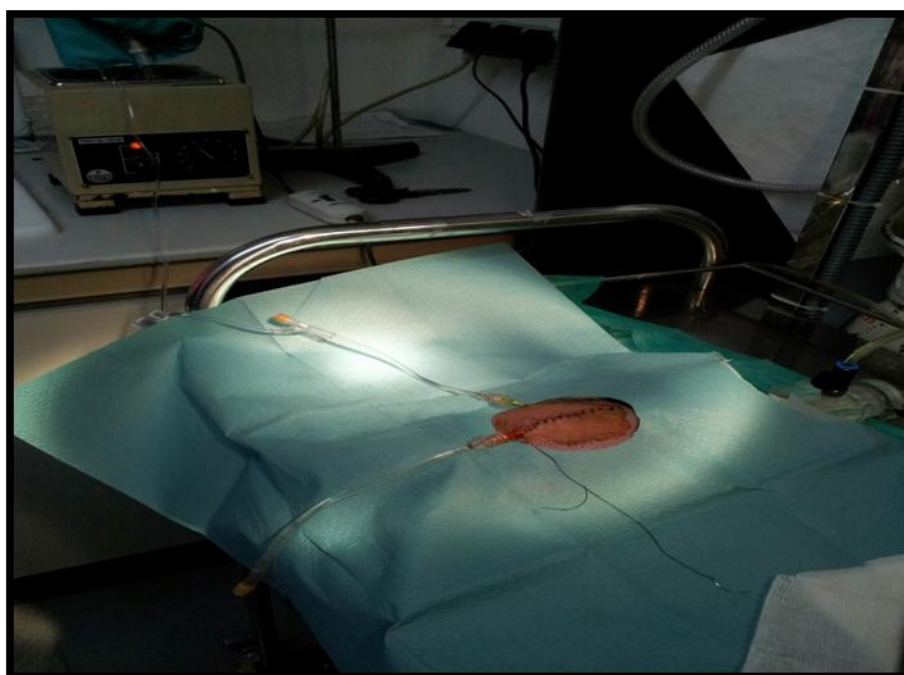
Figura 11.- Proceso de inducción de pancreatitis aguda en rata obesa (Zucker).



2.2. Modelo experimental de lavado peritoneal.

El drenaje peritoneal de la ascitis se realizó empleando una cánula de entrada ubicada en el lado derecho del abdomen, y una cánula de salida situada en la línea central de la cirugía empleada para la inducción de la pancreatitis (Fig. 12). Para evitar el colapso de la cánula de salida se practicaron perforaciones en la misma cánula, de diferentes diámetros, y se envolvió con una gasa estéril que evitó la posible entrada de grasa abdominal en el conducto. El suero salino estéril se perfundió a 37°C con un flujo de 1.4 ml/minuto. Durante todo el proceso, el animal permaneció anestesiado con isoflurano inhalado, debido a que el lavado se mantuvo durante las 6 horas posteriores a la inducción hasta el instante del sacrificio del animal.

Figura 12.- Modelo experimental de lavado peritoneal en rata obesa (*Zucker*).



2.3. Diseño del estudio de la pancreatitis aguda necrótica.

2.3.1. Grupos de estudio para conocer el papel de la hemoglobina del líquido ascítico en la evolución local y sistémica de la pancreatitis aguda necrótica.

La primera parte del trabajo estuvo enfocada a la identificación de la hemoglobina libre en el líquido ascítico asociado a la pancreatitis aguda. También se estudió el origen de la hemoglobina a partir de la actividad hemolítica de la ascitis. Se emplearon 5 ratas por grupo. Para ello, se han distribuido los animales en diferentes grupos:

- Grupo 1: animales anestesiados y sacrificados a las 0 h, que serán utilizados como control.
- Grupo 2: animales anestesiados y sacrificados 30 min tras la inducción de la pancreatitis aguda.
- Grupo 3: animales anestesiados y sacrificados 1 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.
- Grupo 4: animales anestesiados y sacrificados 3 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.
- Grupo 5: animales anestesiados y sacrificados 6 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.
- Grupo 6: animales anestesiados y sacrificados 24 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.

Una vez finalizada esta fase del experimento, se analizó del papel de la hemoglobina extracelular, presente en la ascitis, en el desarrollo de la pancreatitis aguda a nivel sistémico. Para llevar a cabo el estudio, se emplearon 6 ratas por grupo experimental. Las ratas con pancreatitis aguda necrótica fueron sacrificadas a las 6 horas de la inducción. La hemoglobina purificada y filtrada (ver punto 2.4 de Material y Métodos) fue inyectada intraperitonealmente a uno de los grupos por medio de dos inyecciones. En la primera inyección, realizada inmediatamente después de la inducción de la PA y tras la sutura de la laparoscopia, se administró un volumen de 1.5 ml de hemoglobina purificada de concentración 5 g/dl. Transcurridos 90 minutos después de la inducción de la pancreatitis se practicó una nueva inyección, esta vez con un volumen de 1 ml. Al otro grupo de PA se le realizaron las mismas inyecciones con suero fisiológico.

- Grupo 7: animales anestesiados y sacrificados a las 0 h, que serán utilizados como control.
- Grupo 8: animales anestesiados y sacrificados 6 h tras la inducción de la pancreatitis aguda e inyección de suero fisiológico.
- Grupo 9: animales anestesiados y sacrificados 6 h tras la inducción de la pancreatitis aguda e inyección de hemoglobina.

Tras la recogida del líquido ascítico, se realizó el sacrificio de dichos animales por exanguinación, tras previa anestesia. A continuación del sacrificio, se obtuvo plasma, grasa, necrosis grasa, páncreas, hígado y pulmón para realizar las diferentes determinaciones en los tejidos extraídos.

La obtención de las muestras de plasma y líquido ascítico se realizó mediante extracción, con una jeringa impregnada en K₃.EDTA, de sangre y ascitis. Se introdujo en un tubo de recogida de sangre que tenía como anticoagulante K₃-EDTA (Aquisel[®], Barcelona, España). Se centrifugaron a 1800 rpm durante veinte minutos a temperatura ambiente. Se guardó el sobrenadante a -80°C hasta su utilización.

Los tejidos fueron congelados mediante la técnica del *freeze-clamp*, almacenando el tejido hasta su utilización a -80°C.

2.3.2. Grupos de estudio para el análisis del estrés oxidativo y del metabolismo lipídico en ratas obesas con pancreatitis aguda.

El estudio estuvo compuesto por los siguientes grupos experimentales:

- Grupo 1: ratas control (*lean*) anestesiadas y sacrificadas a las 0 h.
- Grupo 2: ratas obesas (*Zucker*) anestesiadas y sacrificadas a las 0 h.
- Grupo 3: ratas control (*lean*) anestesiadas y sacrificadas 1 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.
- Grupo 4: ratas obesas (*Zucker*) anestesiadas y sacrificadas 1 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.
- Grupo 5: ratas control (*lean*) anestesiadas y sacrificadas 6 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.

- Grupo 6: ratas obesas (*Zucker*) anestesiadas y sacrificadas 6 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.

El número de animales utilizados osciló entre 7 y 10 por grupo. El sacrificio fue llevado a cabo por exanguinación, tras previa anestesia. En la recogida de muestras se incluyó ascitis, plasma, grasa, necrosis grasa, páncreas, hígado y pulmón.

El plasma y la ascitis se obtuvieron siguiendo el procedimiento anteriormente explicado (apartado 2.3.1.).

Los tejidos fueron congelados mediante la técnica del *freeze-clamp*, almacenando el tejido hasta su utilización a -80°C.

2.3.3. Grupos de estudio para conocer el efecto del lavado peritoneal en la evolución de la pancreatitis aguda en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*).

Para llevar a cabo el experimento del lavado peritoneal se realizaron los siguientes grupos:

- Grupo 1: ratas control (*lean*) anestesiadas y sacrificadas a las 0 h.
- Grupo 2: ratas obesas (*Zucker*) anestesiadas y sacrificadas a las 0h.
- Grupo 3: ratas control (*lean*) anestesiadas y sacrificadas 6 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.
- Grupo 4: ratas obesas (*Zucker*) anestesiadas y sacrificadas 6 h tras la inducción de la pancreatitis aguda.
- Grupo 5: ratas control (*lean*) anestesiadas y sacrificadas 6 h tras la inducción de la pancreatitis aguda y con lavado peritoneal.
- Grupo 6: ratas obesas (*Zucker*) anestesiadas y sacrificadas 6 h tras la inducción de la pancreatitis aguda y con lavado peritoneal.

El número de animales empleado en cada grupo experimental fue de 7 a 10. Para asegurar una mayor fiabilidad en la comparación de resultados, los grupos experimentales 3 y 4 también se mantuvieron bajo el efecto de la anestesia las 6 horas previas al sacrificio. El sacrificio se realizó mediante el procedimiento explicado anteriormente. Igual que en los estudios previos, se

analizaron las siguientes muestras: ascitis, plasma, grasa, necrosis grasa, páncreas, hígado y pulmón.

El plasma y la ascitis se obtuvieron siguiendo el procedimiento anteriormente explicado (apartado 2.3.1.).

Los tejidos fueron congelados mediante la técnica del *freeze-clamp*, almacenando el tejido hasta su utilización a -80°C.

2.4. Purificación de hemoglobina.

2.4.1. Fundamento.

La purificación de la hemoglobina se realizó a partir de eritrocitos lisados y utilizando como técnica analítica una cromatografía de intercambio aniónico (Sun y Palmer, 2008), empleando como resina el polisacárido Q-sepharose XL (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) empaquetada en columnas XK 26/40 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). La técnica de intercambio aniónico permite la separación de los analitos basándose en las propiedades de carga eléctrica de los mismos.

El proceso cromatográfico consta de dos fases, una fase estacionaria insoluble que muestra en la superficie grupos funcionales iónicos que interactúan con iones de carga opuesta del analito, y una fase móvil que eluye a través de la columna compitiendo con los analitos por los sitios de unión de la matriz o fase estacionaria. La selección del analito dependerá del pH y de la concentración iónica de la fase móvil.

2.4.2. Procedimiento.

El proceso de obtención de hemoglobina se llevó a cabo en dos pasos, lisado de los glóbulos rojos procedentes de sangre de rata *Wistar* y posterior purificación de la hemoglobina mediante cromatografía a partir de este lisado.

El lisado de glóbulos rojos se obtiene a partir de la extracción de sangre, mediante punción intracardíaca, a un total de doce ratas *Wistar* con un peso aproximado de 600 gramos. El volumen final conseguido se distribuye en diferentes tubos para una primera centrifugación a 1800 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. En esta centrifugación se selecciona la fracción eritrocitaria. A continuación, se realiza el lavado de los glóbulos rojos con suero salino isotónico (0,9% w/v) para eliminar restos de proteínas plasmáticas, leucocitos y plaquetas, mediante dos centrifugaciones a 2000 rpm durante 10 minutos. El precipitado obtenido se resuspende en tampón Tris-HCl 20 mM (pH=8,2) y se incuba durante dos horas a 4°C para provocar la lisis de los glóbulos rojos. Posteriormente, se completa la hemólisis mediante

sonicación. Por último, se efectúa una nueva centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos, conservando el sobrenadante obtenido.

En este punto hay que destacar la rápida precipitación que se produce en el lisado en estas condiciones. Para evitar problemas de cristalización posteriores, los lisados se incuban a 4°C durante doce horas. Una vez finalizada la incubación, se centrifuga a 15000 rpm durante 10 minutos para eliminar la fracción que ha precipitado del lisado.

Una vez obtenido el lisado, se preparan las columnas cromatográficas de intercambio aniónico, XK 26/40, con la resina Q-sepharose XL a temperatura ambiente mediante la técnica *ethanol-slurry-packing* (Sun y cols., 2004). Las columnas se equilibran con el tampón A (Tris-HCl 20 mM pH=8,2) y se lavan con una solución de NaCl 2M para eliminar impurezas absorbidas dentro de la columna.

A continuación, se cargan los lisados en la columna y se añade el tampón A para lavar la columna. Para la extracción de la hemoglobina se emplea un gradiente de elución lineal creado por tres tampones de concentración 90/10, 75/25, 25/75 (tampón A/tampón B), siendo el tampón B, 20 mM Tris-HCl, plus 0,2 M NaCl pH=8,2. Una vez recogido el eluato con el último tampón, se liofiliza y se congela el liofilizado a -80°C hasta su utilización.

2.5. Técnica de MALDI-TOF.

La identificación de la hemoglobina presente en el líquido ascítico fue llevada a cabo mediante la técnica de MALDI-TOF. 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*.

2.5.1. Fundamento.

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.

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. En este punto, la muestra es irradiada con un láser de nitrógeno. La macromolécula es ionizada por las colisiones y por la 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”.

El tiempo de vuelo (TOF) se basa en la interrelación de la masa y la velocidad de los iones a una energía cinética constante. 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 por tanto se puede determinar la masa de los iones.

2.5.2. Procedimiento.

La muestra de líquido ascítico se hizo migrar a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida. Tras la electroforesis, se seleccionó la banda candidata con actividad peroxidasa y se llevó a analizar al espectrómetro de masas TRIPLETOF[®]5600 (AB Sciex, Framingham, USA) del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE).

2.5.3. Cálculos.

El procesado de los datos obtenidos por MALDI-TOF se realiza usando el programa MASCOT.

El MASCOT es un potente programa desarrollado por *Matrix Science* (Boston, USA) 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 (NCBI, 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.

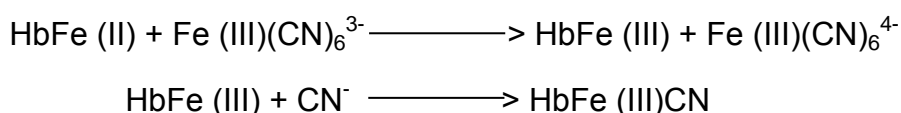
2.6. Determinación de hemoglobina extracelular.

La hemoglobina extracelular o libre se determinó en muestras de plasma y líquido ascítico mediante el reactivo de Drabkin.

2.6.1. Fundamento.

El Fe (II) de todas las formas de hemoglobina, a excepción de la sulfohemoglobina, es oxidado por el ferrocianuro a Fe (III) convirtiéndolas en metahemoglobina que, a su vez, reacciona con cianuro ionizado (CN⁻) formándose cianmetahemoglobina, un derivado muy estable que absorbe a 540 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de hemoglobina.

pH 7.2



2.6.2. Procedimiento.

En primer lugar, se prepara el reactivo de Drabkin con una concentración de 50x. La composición de este reactivo es la siguiente, ferricianuro potásico 30 mM, cianuro potásico 38 mM, fosfato monopotásico 50 mM, tensiactivo (Igepal CA-630, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 2,5 % (p/v).

Las condiciones del ensayo son:

- Longitud de onda → 540 nm (520-560)
- Cubeta → 1 cm paso de luz
- Temperatura → 15-25°C

Una vez preparado el reactivo a concentración 1x, se mezclan en una cubeta 625 µl del mismo y 25 µl de muestra. Se incuban durante 3 minutos a temperatura ambiente y se procede a la lectura de la absorbancia frente al blanco del reactivo.

2.6.3. Cálculos.

$$((A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco}) \times \text{factor} = \text{g/dl Hb}$$

El factor de conversión tiene un valor de 3,68.

2.7. Determinación de la capacidad hemolítica del líquido ascítico.

2.7.1. Fundamento.

Analizar la posible capacidad hemolítica del líquido ascítico mediante la incubación con glóbulos rojos procedentes de sangre de rata *Wistar*.

2.7.2. Procedimiento.

Para llevar a cabo el experimento se extrajo el líquido ascítico y la sangre a ratas *Wistar* anestesiadas y sacrificadas 6 h tras la inducción de la pancreatitis aguda, utilizando como anticoagulante K₃-EDTA. Se dividió la sangre entera de cada rata en cinco tubos de microcentrífuga, utilizando un volumen de 250 microlitros en cada tubo. Se centrifugaron a 1800 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente y se recogió y conservó el sobrenadante (plasma), dejando la fracción eritrocitaria en el tubo. El líquido ascítico también se centrifugó en esas condiciones y se conservó el sobrenadante.

A continuación, se realizaron incubaciones a 37°C durante 45 minutos con agitación de 300 rpm en los 5 tubos con glóbulos rojos:

- Tubo 1: Eritrocitos + 250 microlitros de plasma
- Tubo 2: Eritrocitos + 250 microlitros de suero salino
- Tubo 3: Eritrocitos + 250 microlitros de ascitis
- Tubo 4: Eritrocitos + 250 microlitros de ascitis + inhibidor proteasas
- Tubo 5: Eritrocitos + 250 microlitros de suero salino + sonicación posterior (para conseguir hemólisis total)

Para evitar problemas de histocompatibilidad se realizaron las incubaciones entre muestras obtenidas de la misma rata. Posteriormente, se centrifugaron de nuevo los tubos a 1800 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante para realizar las determinaciones.

2.7.3. Cálculos.

Se determinó la concentración de hemoglobina en el sobrenadante de cada uno de los tubos (apartado 2.6). Las concentraciones obtenidas se expresaron en porcentaje frente a la concentración obtenida en el tubo 5.

2.8. Determinación cuantitativa de bilirrubina.

Para la determinación de bilirrubina total y conjugada se utilizó el kit *Bilirubin T&D*[®] (Spinreact, Girona, España).

2.8.1. Fundamento.

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose espectrofotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada.

2.8.2. Procedimiento.

Las condiciones del ensayo son:

- Longitud de onda → 555 nm (530-580)
- Cubeta → 1 cm paso de luz
- Temperatura → 15-25°C

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se ajusta a cero el espectrofotómetro frente a agua destilada. Para determinar la bilirrubina directa o conjugada se emplea el R1 del kit, que contiene ácido sulfanílico y ácido clorhídrico y el R3 (nitrito de sodio). Se pipetea en una cubeta 750 µl de R1, 25 µl de R3 y 50 µl de muestra, se agitan, y posteriormente se incuban 5 min a 15-25°C y se lee la absorbancia.

Para la bilirrubina total, se realiza el mismo procedimiento cambiando el R1 por R2, que contiene además DMSO. Para ambas medidas se realiza un blanco sin muestra.

2.8.3. Cálculos.

Una vez obtenidas las absorbancias se aplica la fórmula:

$$((A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco Muestra}) \times \text{Factor} = \text{mg/dL}$$

El factor de conversión es 19,1 en el caso de la bilirrubina total y 14 si determinamos la bilirrubina directa.

2.9. Cuantificación de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas en una muestra biológica se empleó el *Pierce BCA Protein Assay Kit*[®] (Thermo Scientific, Waltham, USA).

2.9.1. Fundamento.

Es un método colorimétrico basado en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} , en presencia de proteínas y en medio alcalino (reacción de Biuret), y posterior reacción del ión Cu^{+1} con dos moléculas de ácido bicinconínico (BCA), dando lugar al complejo coloreado que podemos detectar.

2.9.2. Procedimiento.

En primer lugar, se prepara la solución formada por el reactivo A y el reactivo B del kit. La proporción de volumen entre los reactivos A y B es 50:1, respectivamente. Se pipetea en la placa de 96 pocillos un volumen de muestra de 3 μl por triplicado. Para la correcta determinación de proteínas, se prepara una recta patrón realizada con seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en concentraciones comprendidas entre 20 y 0.3125 mg/ml. El volumen de los patrones añadido a la placa es de 3 μl y también por triplicado. Por último se prepara un blanco con 3 μl agua.

Se añaden 260 μl de la mezcla de reactivos a la recta patrón, al blanco y a las muestras. Se incuban durante 30 min a 37°C, en leve agitación y en oscuridad.

La lectura espectrofotométrica se realiza a 562 nm de longitud de onda.

2.9.3. Cálculos.

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

2.10. Determinación de la actividad peroxidasa.

2.10.1. Fundamento.

El método de cuantificación de la actividad peroxidasa se basa en la capacidad de estas enzimas para oxidar tetrametilbenzidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno, formando un producto azulado que se puede cuantificar mediante espectrofotometría.

Para determinar el índice de infiltración leucocitaria se utilizará una peroxidasa que se encuentra fundamentalmente en neutrófilos y monocitos, la mieloperoxidasa (MPO), enzima que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso, agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos

2.10.2. Procedimiento.

En el caso de la determinación de la actividad mieloperoxidasa, previamente habrá que realizar su extracción para separarla del resto de peroxidasas existentes en la muestra.

El protocolo de extracción de la enzima mieloperoxidasa comienza con la homogeneización del tejido en tampón fosfato monopotásico a pH 6, en una concentración de 100 mg/ml de tampón. El homogenado se centrifuga a 20000g durante 20 minutos a 4°C. En esta centrifugación facilitamos la separación de la MPO del resto de peroxidasas. El sobrenadante se conserva para cuantificar proteínas. El precipitado se resuspende en 1 ml de fosfato monopotásico a pH 6 al que se le añade un detergente para conseguir la ruptura de los gránulos. Para ayudar a esta ruptura, se somete a las muestras a tres ciclos de sonicación, congelación y descongelación. Tras estos procesos se realiza una incubación a 60°C durante dos horas para eliminar posibles inhibidores de la enzima. Para finalizar el protocolo, se realiza una centrifugación a 15000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, recogiendo el sobrenadante para la determinación.

La reacción de la actividad peroxidasa se lleva a cabo en una placa de 96 pocillos, donde se añade a la muestra el TMB, en primer lugar, y a continuación el peróxido de hidrógeno, dando comienzo a la reacción catalizada por la peroxidasa.

La cinética de la enzima se estudia mediante nueve lecturas cada 20 segundos a 620 nm y se expresa en mU/mg proteína, siendo la U la cantidad de TMB oxidado en un minuto.

2.10.3. Cálculos.

La actividad de las muestras se determina por comparación con una curva estándar de peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) de actividad enzimática conocida que se ha construido previamente. El rango de valores incluirá desde 1,5 mU/ml hasta 100 mU/ml.

2.11. Determinación de malondialdehído.

2.11.1. Fundamento.

Los niveles de malondialdehído (MDA) fueron determinados en plasma y líquido ascítico de acuerdo con Wong y cols. (1987). Para llevar a cabo las determinaciones, es necesario derivatizar las muestras con ácido tiobarbitúrico, formándose un aducto, TBARS, que puede ser analizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Este método se basa en la hidrólisis de los lipoperóxidos presentes en la muestra y posterior formación de un aducto entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malondialdehído liberado (TBA-MDA₂). Puesto que el ácido 2-tiobarbitúrico reacciona con distintos grupos carbonilos presentes en la muestra, además de con el malondialdehído, se realiza una separación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa del aducto ácido 2-tiobarbitúrico-malondialdehído del resto de las sustancias reaccionantes presentes en las muestras.

2.11.2. Procedimiento.

Para la derivatización de la muestra se necesitan tres tampones:

- Tampón 1 de acetonitrilo sódico 2M pH 3,5 + TBA 0.2%.
- Tampón 2 de fosfato monopotásico 50 mM pH 6,8.
- Tampón 3 de fosfato monopotásico 50 mM pH 3,5.

La derivatización se realiza añadiendo 50 µl de muestra a 500 µl del tampón 1. Se incuba durante 1 hora a 95°C. En este paso se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y su conjugación con el TBA. Una vez finalizada la incubación se adicionan 500 µl del tampón 2 y se centrifuga a 13000 rpm, 5 minutos a 4°C. Para finalizar y tener la muestra preparada para el autoinyector, se recoge el sobrenadante y se mezclan 200 µl con otros 200 µl del tampón 3.

2.11.3. Condiciones cromatográficas.

Se requieren dos fases móviles:

- Fase A → Fosfato monopotásico 50 mM pH 6,8 + acetonitrilo (83/17).
- Fase B o de lavado → Acetonitrilo al 70%.

La fase estacionaria consiste en una columna Kromasil[®] 100-5C8, 15x0,46 cm (Teknocroma, Barcelona, España).

Todo el proceso se realiza a un flujo constante de 1 ml/minuto y la lectura se efectúa a 532 nm.

El tiempo de retención del aducto TBA-MDA₂ es de aproximadamente 4,5 minutos y el cromatograma tiene una duración de 50 minutos.

2.11.4. Cálculos.

El área del pico correspondiente al aducto TBA-MDA₂ se valora frente a una recta patrón construida con MDA-bis (Sigma Aldrich, Missouri, USA) disuelto en agua bidestilada. En la construcción de la recta patrón debe incluirse un blanco. La recta patrón se hace a partir de las siguientes soluciones de MDA-bis: blanco; 0,391 μM ; 0,7813 μM ; 1,5625 μM ; 3,125 μM ; 6,25 μM ; 12,5 μM y 25 μM .

El programa utilizado para la integración de picos es *Trilution*[®] LC.

2.12. Determinación de isoprostanos libres.

Un isoprostano libre representativo, 15-isoprostano F_{2t}, fue determinado en plasma y líquido ascítico mediante el kit *Enzyme Immunoassay* (Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, USA). La determinación se llevó a cabo mediante la técnica de inmunoensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

2.12.1. Fundamento.

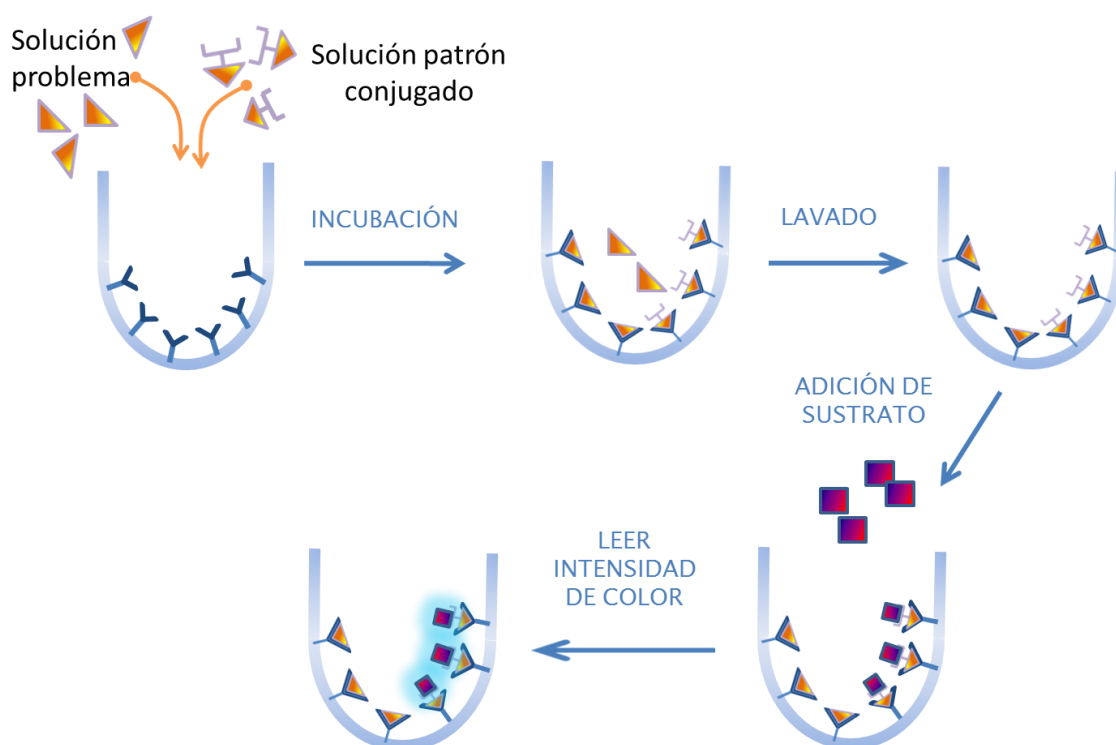
La técnica ELISA es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno o anticuerpo, inmovilizado sobre una fase sólida, se detecta directa o indirectamente mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable. Este producto puede ser colorimétrico y puede cuantificarse mediante espectrofotometría.

En el ELISA directo, las soluciones problema se incuban con anticuerpos marcados, y nos determinarán la presencia o no del antígeno en la muestra. En el ELISA indirecto se emplean dos clases de anticuerpos, uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario.

Para la determinación de isoprostanos se empleó una variante del ELISA directo, llamado ELISA sándwich de competición (Fig. 13). En esta modalidad tendremos un anticuerpo (anti-isoprostano) adsorbido en el fondo del pocillo de la placa. La técnica consiste en incubar en el mismo pocillo la muestra problema y una concentración conocida del isoprostano que queremos cuantificar conjugado con una enzima. Al realizar los lavados, se añadirá un

sustrato que reaccionará con esta enzima conjugada y dará un determinado color cuantificable. Se llama de ELISA de competición porque los isoprostanos presentes en la muestra problema competirán con los conjugados por los anticuerpos adsorbidos en el pocillo. A mayor concentración en la muestra, menor densidad óptica tras la incubación con el sustrato.

Figura 13.- Esquema de la técnica de ELISA directo de competición.



2.12.2. Procedimiento.

Debido a la alta concentración de proteínas y otras sustancias, presentes en el plasma y en el líquido ascítico, que pueden interferir en el inmunoensayo, es recomendable un proceso de purificación de la muestra mediante extracción en fase sólida (SPE) con columnas *C₁₈ Sep Pak[®]* de Waters (Massachusetts, USA).

El proceso de extracción comienza llevando las muestras a pH 3. Se recomienda un volumen mínimo de 500 µl. Una vez activada la columna con etanol y agua ácida, se eluye la muestra a través de la columna. A continuación, se realizan dos lavados con agua ácida y heptano, descartando estos eluyentes. Por último, se eluye la muestra de la columna con una mezcla

de acetato de etilo y heptano (1:1). El eluato se evapora en atmósfera de nitrógeno. En este momento se puede congelar a -80°C el residuo oleoso obtenido tras la evaporación.

Para la realización del inmunoensayo se resuspende el residuo oleoso en el tampón de dilución facilitado por el fabricante, con un volumen igual al de la muestra previa a la extracción. A partir de aquí pipeteamos en los pocillos de la placa siguiendo las indicaciones del kit.

Al tratarse de un ELISA de competición, se añade a todos los pocillos una concentración conocida de un estándar del isoprostano conjugado con la enzima responsable de cambiar la coloración del sustrato.

2.12.3. Cálculos.

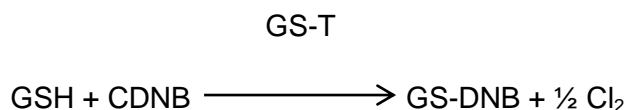
La concentración del 15-isoprostano F_{2T} se determina mediante comparación con una recta de patrones incluida en el kit. Al ser un ELISA de competición, la intensidad de la coloración obtenida es inversamente proporcional a la concentración de la molécula en la muestra.

La lectura se realiza a 450 nm.

2.13. Determinación de glutatión reducido.

2.13.1. Fundamento.

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



2.13.2. Procedimiento.

Las muestras de tejido se homogenizan con ácido perclórico al 6% y EDTA 1 mM, en una concentración de 100 mg de tejido por mililitro de tampón. A continuación, los homogenizados se centrifugan a 15000 g durante 15 minutos a 4°C . Los sobrenadantes ácidos se usan para el ensayo. El sedimento o *pellet* se utiliza para la cuantificación de proteínas, valor que se emplea para

normalizar las medidas obtenidas en las distintas muestras. Para la cuantificación de proteínas, en primer lugar, se mide exactamente el volumen de sobrenadante ácido. A continuación, se añade este volumen conocido al *pellet* obtenido en la centrifugación del homogenado, empleando como disolvente NaOH 1N. Se recomienda una incubación a 60°C durante varias horas para facilitar la resuspensión del sedimento y poder realizar la medida de proteínas.

En una microcubeta se añaden los siguientes reactivos:

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

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

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

2.13.3. Cálculos.

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

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

Los valores se expresan en nmoles/mg prot.

2.14. Aislamiento de ARN.

La extracción de ARN total de tejido debe realizarse utilizando *RNA later* (Qiagen, Venlo, Países Bajos), cuya función es estabilizar el ARN. Se aíslan de 25 a 30 mg de tejido y se sumergen inmediatamente en 0,5 ml de solución *RNA Later*. La extracción total de ARN se lleva a cabo mediante el reactivo Trizol[®] de Invitrogen (Carlsbad, USA). Este reactivo contiene tiozianato de guanidina (desnaturaliza ARNasa, contribuye a la ruptura de la membrana plasmática y separa el ARNr) y fenol (solvente orgánico saturado con agua o tampón tris). Ambos componentes disuelven ARN, ADN y proteínas. Destacar que el aislamiento del ARN del tejido pancreático debe realizarse en un plazo no superior a las 24 horas desde su extracción, para evitar la degradación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra por la acción de las ARNasas digestivas del páncreas. El resto de tejidos estudiados, adiposo, hepático y pulmonar, pueden congelarse a -80°C, tras añadir *RNA later*, hasta el momento de su utilización sin riesgo en la degradación de la muestra.

Los distintos tejidos se homogenizan en 0,5 ml de trizol. Tras una centrifugación de 10 min a 10000g a 4°C, se conserva el sobrenadante. Para ayudar a la extracción, se añade al sobrenadante cloroformo, en un volumen de 0,2 ml/ml trizol. El cloroformo separa el fenol y distribuye la mezcla en tres fases tras una centrifugación de 15 min a 10000g a 4°C, una orgánica inferior de color rojo (proteínas), interfase de color blanco (ADN) y una fase acuosa superior donde se encuentra el ARN. Al recoger la fase acuosa, se añade isopropanol (0,5 ml/ml trizol), alcohol muy miscible con el agua y que ayuda a la deshidratación del ARN. Se deja en incubación durante 10 min y posteriormente, se centrifuga a 10000g durante 10 min a 4°C, para conseguir la precipitación del ARN. Se elimina el isopropanol y se añade etanol, preferentemente frío, al 75% (1 ml EtOH 75%/ml trizol), para eliminar restos de isopropanol y seguir manteniendo precipitado el ARN. Se centrifuga a 7500g a 4°C durante 5 min. Se elimina el etanol y se deja secar al aire durante 5 minutos, aproximadamente, para que se evapore el resto.

El ARN se redisuelve con 25 µl de agua libre de ARNsas. Se aísla una alícuota para comprobar la integridad y cuantificar el ARN mediante espectrofotometría, el resto se congela a -80°C hasta su uso. La concentración de ARN se estima midiendo la absorbancia a 260 nm y su pureza con el ratio A_{260}/A_{280} . El ARN se considera puro cuando el ratio tiene un valor comprendido entre 1,8 y 2.

2.15. Retrotranscripción-amplificación del ARN.

2.15.1. Fundamento.

Para el estudio de la expresión de genes de interés, una vez extraído el ARN total, se realiza una retrotranscripción para el paso del ARN a ADNc. Posteriormente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplifica el ADN utilizando *primers* específicos.

La PCR es una técnica que se desarrollará en diferentes etapas:

- Inicio → Choque térmico a altas temperaturas para activación de ADN polimerasas.
- Desnaturalización de la doble hebra de ADN → 95°C (30s)
- Hibridación *primers* → T^a óptima de unión de oligonucleótidos o temperatura de *melting*. Oscila alrededor de 60°C (30s).
- Elongación → Siempre en dirección 5'→3' a velocidad de 1000 pb/minuto (72°C).

2.15.2. Retrotranscripción del ARN total.

Las alícuotas de ARN se someten a retrotranscripción con el kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*[®] de Thermo Scientific (Waltham, USA) durante 50 min a 42°C, utilizando como cebador hexámeros aleatorios. Para inactivar la enzima se incubó la muestra durante 15 min a 70°C.

2.15.3. Análisis del ARN total retrotranscrito por PCR cuantitativa.

Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real de las muestras de ADNc se realizaron en el termociclador acoplado a fluorescencia *iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, California, USA). Cada reacción se llevó a cabo por triplicado y las curvas de fusión se construyeron mediante el programa *iQ Real Time Detection System Software* (Bio-Rad, California, USA), para asegurar que sólo se amplifica un único producto de PCR.

Para algunos de los genes estudiados se diseñaron oligonucleótidos específicos que fueron sintetizados por IDT Technologies (Iowa, USA) (tabla 4) utilizándose como agente fluorescente *Sybr Green PCR Master Mix* (Takara, California, USA). Como control de carga se usó el gen *rplp0*, encargado de codificar la proteína ribosomal P0 de la subunidad 60S. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15

segundos a 95°C, 30 segundos a 60-64°C (según la temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos) y 30 segundos de elongación a 72°C.

Para otros genes se emplearon sondas comerciales *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) (tabla 5). En estos casos la amplificación se llevó a cabo con *TaqMan Master Mix 2X* en las mismas condiciones, siendo la temperatura de hibridación en todos los casos de 60°C.

2.15.4. Cálculos.

La expresión relativa de ARNm se calcula utilizando el ciclo umbral (CT) de cada gen empleando las siguientes fórmulas:

- $\Delta CT = CT \text{ gen problema} - CT \text{ gen control}$
- $\Delta(\Delta CT) = \Delta CT \text{ gen problema} - \Delta CT \text{ promedio de grupo control}$
- $\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta(\Delta CT)}$

Tabla 4.- Oligonucleótidos específicos utilizados para la qRT-PCR.

Gen diana	Oligonucleótidos directos/reversos	T ^a hibridación
<i>ho-1</i>	5'-TTGAGCTGTTTGAGGAGCTG-3' 5'-TGCTGATCTGGGATTTTCCT-3'	64°C
<i>inos</i>	5'-CTATTCCCAGCCCAACAACA-3' 5'-CCCAGTTTTTGATCCTCACG-3'	62°C
<i>vegfa</i>	5'-GTACCTCCATGCCAAGT-3' 5'-CACTCCAGGGCTTCATCATT-3'	60°C
<i>enos</i>	5'-GGGGGAAACTGCAGGTATTT-3' 5'-AGCTGGCTGTTCCAGATCC -3'	60°C
<i>hexoquinasa-2</i>	5'-GGGAAGCAGCTGTTTGAGAA-3' 5'-GACATCTTTGGTCTCGAAGGA -3'	60°C
<i>rplp0</i>	5'-CAGCAGGTGTTTGACAATGG-3' 5'-CCCTCTAGGAAGCGAGTGTG-3'	62°C

Tabla 5.- Oligonucleótidos comerciales (Sondas TaqMan®) utilizados para la qRT-PCR.

Gen diana	Sonda	T ^a hibridación
<i>tnf-α</i>	Rn01525859_g1	60°C
<i>il-1β</i>	Rn00580432_m1	60°C
<i>il-6</i>	Rn01410330_m1	60°C
<i>il-10</i>	Rn00563409_m1	60°C
<i>rplp0</i>	Rn03302271_gH	60°C

2.16. Western Blot.

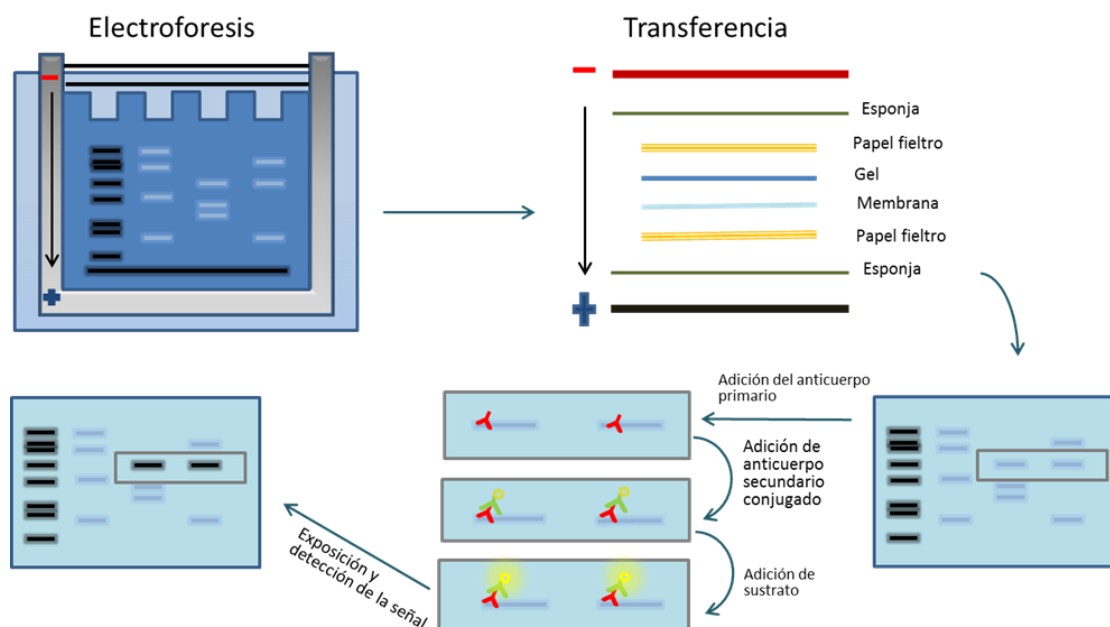
2.16.1. Fundamento.

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

La electroforesis es una migración bajo la acción de un campo eléctrico a través de geles verticales con una matriz de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (*SDS PAGE*) en condiciones desnaturalizantes. La separación en estas condiciones se produce por el peso molecular de cada proteína. A continuación, se coloca el gel migrado en contacto con una membrana de nitrocelulosa y se crea un campo eléctrico que empuje a las proteínas a salir del gel, llamado este proceso electrotransferencia. Este proceso permite la posterior incubación de la membrana con distintos anticuerpos. Por último, tendrá lugar la inmuno-quimioluminiscencia, que consiste en la reacción, catalizada por la peroxidasa de rábano conjugada al anticuerpo añadido a la

membrana, de peróxido de hidrogeno con un agente comercial denominado *LumiGLO[®] reagent*, dando una quimioluminiscencia cuantificable (Fig. 14).

Figura 14.- Esquema de la técnica de *Western blotting*.



2.16.2. Procesado de la muestra.

Las muestras de tejido se congelan inmediatamente a -80°C hasta su homogenización en tampón de extracción (100 mg/ml) sobre hielo. Para las muestras de hígado y pulmón el tampón de extracción empleado contiene 20 mM Tris-HCl (pH=7.5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Igepal, 30 mM pirofosfato sódico, 50 mM NaF y 50 μM ortovanadato sódico. Un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) se añade en una concentración de 10 $\mu\text{l/ml}$ antes de su uso.

Para las muestras de tejido adiposo blanco, el tampón de homogeneización utilizado se compone de tampón fosfato potásico 50 mM (pH=7.4), 0.1 mM EDTA, 1% Igepal, 30 mM pirofosfato sódico, 50 mM NaF y 50 μM ortovanadato sódico. También se añade el cóctel de inhibidores de proteasas a una concentración de 10 $\mu\text{l/ml}$.

2.16.3. Condiciones del gel y transferencia.

Se cargan homogenados de tejido con una cantidad de proteína de 25 a 50 μg en geles discontinuos *Criterion[®]* de Bio-Rad (California, USA), con una zona de empaquetado (*staging*) de baja concentración de acrilamida y una

zona de resolución (*running*) de alta concentración de acrilamida. El empaquetado tiene un porcentaje de acrilamida menor que facilita la entrada y la compactación de las muestras en el gel. La zona de resolución se compone de acrilamida en gradiente del 4 al 12% 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 120 voltios durante al menos 2 h en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3).

Una vez finalizado el desplazamiento electroforético, el gel es transferido (*Western Blot*) a una membrana de nitrocelulosa (*iBlotGel[®] Transfer Stacks*) (Invitrogen, Carlsbad, USA) mediante transferencia en seco.

2.16.4. Visualización.

- 1.- Tras la transferencia, las membranas se incuban 60 min a temperatura ambiente en tampón de bloqueo (evita uniones inespecíficas de los anticuerpos): 5% p/v de leche desnatada en polvo y TBS-T que se compone de 0,1% Tween-20 en TBS 1x (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6).
- 2.- Se realizan 3 lavados de 5 min con 15 ml de TBS-T.
- 3.- Las membranas se incuban el tiempo que determina el anticuerpo primario empleado con agitación orbital en tampón de anticuerpo (1% BSA, en TBS-T) y con la correspondiente dilución de trabajo para el anticuerpo primario utilizado (tabla 6)
- 4.- Se realizan 3 lavados de 5 min con 15 ml de TBS-T.
- 5.- Las membranas se incuban 60 min con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti-IgG de conejo, ratón o cabra (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA), según el anticuerpo primario utilizado. El anticuerpo se disuelve en tampón de anticuerpo (1:20000).
- 6.- Se realizan 3 lavados de 5 min con 15 ml de TBS-T.
- 7.- La membrana se incuba 5 minutos con el kit *PhototopeTM-HRP Detection[®]* (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) y se revela en el *ChemiDoc MP Imaging System[®]* (Bio-Rad, California, USA).

2.16.5. Cuantificación de los resultados.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas en el programa *ImageLabTM* de Bio-Rad (California, USA) para poder realizar la densitometría.

Tabla 6.- Descripción de los anticuerpos utilizados para *Western blotting*.

Anticuerpo	Descripción	Casa comercial	P. M.	Fuente	Dilución
Anti lipasa	Detecta epitopo de aa 260-300 de la lipasa pancreática	Santa Cruz	~51 kDa	Conejo	1:750
Anti p44/42 ^{MAPK}	Detecta p44/42 en Thr202 y Tyr204	Cell Signaling	~/42-44kDa	Conejo	1:1000
Anti VEGF	Detecta VEGF recombinante de rata (rr VEGF ₁₆₄)	R&D Systems	~/34-42kDa	Cabra	1:1000
Anti α -tubulina	Reconoce epitopo localizado en C-terminal	Sigma-Aldrich	~50 kDa	Ratón	1:1000

2.17. Determinación de glutatión oxidado y metabolitos de la vía de la transulfuración.

La determinación de estas moléculas en el tejido pancreático se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un tándem de espectrometría de masas (HPLC-MS/MS).

2.17.1. Fundamento.

El sistema cromatográfico consta de un espectrómetro de masas triple-cuadrupolo *MicromassQuattro*TM (Micromass) equipado con una fuente de ionización Z-spray operando en modo ion positivo con un LC-10A Shimadzu (Shimadzu) acoplado al software *MassLynx* 4.1 para el procesado de los datos. Las muestras fueron analizadas por HPLC en fase reversa con una columna C18 *Mediterranean Sea* (Teknokroma, Barcelona, España) (5.0 x 0.21 cm) con 3 μ m de tamaño de partícula.

2.17.2. Procedimiento.

Las muestras de tejido congelado se homogenizan en 400 μ l de PBS y NEM 11 mM. Después, se añade PCA para obtener una concentración final de 4% y se centrifugan durante 15 min a 15000g (4°C). Las concentraciones de GSSG, metionina, S-adenosil metionina (SAM), cisteína y cistina se determinan en los sobrenadantes.

En todos los casos, se inyectan 20 μ l de sobrenadante en la columna analítica. La fase móvil consiste en el siguiente sistema de gradiente (min/%A/%B) (A, 0,5% ácido fórmico; B, isopropanol/acetonitrilo 50/50; 0,5% ácido fórmico): 5/100/0, 10/0/100, 15/0/100, 15.10/100/0 y 60/100/0. El flujo es de 0,2ml/min. Como gas secante y nebulizante se utiliza nitrógeno en un flujo de 500 y 30L/h, respectivamente. Se emplea argón a $1,5 \times 10^{-3}$ mbar como gas de colisión para la disociación inducida por colisión. Para caracterizar los distintos metabolitos se utiliza un ensayo basado en LC-MS/MS con monitorización de reacción múltiple, usando transiciones m/z, energía cono (V), energía de colisión (eV) y tiempo de retención (min).

Tabla 7.- Condiciones experimentales utilizadas en la técnica de espectrometría de masas (HPLC-MS/MS).

Molécula determinada	P. M.	Transición (m/z)	Tiempo retención (segundos)	Cono (voltios)	Energía colisión (eV)
GSSG	612.6	613.2>484.2	6.52	40	17
Cisteína	246.29	247.1>158	(1)5.69;(2)7.45	20	20
Cistina	240.3	241.3>152.3	1.99	27	15
Metionina	149.21	150.5>104	2.64	20	14
SAM	434.9	398.9>250.1	(1)1.07;(2)1.99	20	18

2.17.3. Cálculos.

Las curvas de calibración se obtienen usando seis puntos (0,01 a 100 μ mol/l) estándar (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

Los distintos picos se integran en el software *MassLynx* 4.1. Los resultados se expresan en nanomoles por miligramo de proteína.

2.18. Determinación de la actividad fosfatasa.

Las actividades proteín fosfatasa tipo 1 y tipo 2A (PP1 y PP2A) fueron medidas mediante el kit *Ser/Thr Phospatase Assay System*[®]. Para la actividad proteín tirosín fosfatasa (PTPs) se empleó *Tyrosine Phosphatase Assay System*[®], ambos kits de Promega (Winsconsin, USA).

2.18.1. Fundamento.

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

2.18.2. Procedimiento.

Las muestras de tejido se homogenizan durante 30 segundos en tampón de homogeneización a 4°C en una concentración de 1g por cada 3 ml de tampón. El tamón de homogeneización tiene la composición siguiente.

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

Los extractos de tejidos suelen contener concentraciones milimolares de fosfato libre que pueden interferir con el análisis. Además, altas concentraciones de ATP pueden incrementar el ruido de fondo y producir fosforilación por contaminación de quinasas. Por ello, se requiere eliminar esos componentes de las muestras utilizando un paso previo de cromatografía de exclusión en columnas de resina de *Sephadex*[®] incluidas en el kit.

En primer lugar, se preparan las columnas. Para ello, se añade agua desionizada a la columna dejando que drene. A continuación, se adiciona un tampón Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1mM y azida sódica 0,02% para equilibrar la columna. Se deja eluir el tampón y posteriormente, se centrifuga la columna a 600g durante 5 minutos para eliminar el exceso de tampón.

Una vez están las columnas equilibradas, se centrifugan los homogenados a 100.000g a 4°C durante 1 h, y se recoge el sobrenadante que pasa a través de la resina mediante una centrifugación a 600g durante 5 minutos a 4°C. El eluato obtenido es el que se utiliza para la determinación y para la cuantificación de proteínas.

En este punto se prepara la sonda de molibdato y el fosfopéptido que empleamos como sustrato, que es facilitado por el kit y diferente en el caso de los dos tipos de fosfatasa analizadas (serín/treonín y tirosín fosfatasa).

En el caso de la sonda se añaden 10 µl de la sonda de molibdato/aditivo para 1 ml de la solución de la sonda. El fosfopéptido se prepara a una concentración 1 mM con agua libre de fosfatos (proporcionada en el kit).

El siguiente paso es la preparación de los tampones de reacción, diferentes para ambos tipos de fosfatasa.

Tampón de reacción PP1 y PP2A 5x:

- Imidazol 250 mM, pH 7,2
- EGTA 1 mM
- β-mercaptoetanol 0,1%
- BSA 0,5 mg/ml

En el caso de la determinación de PP2A, se añade tautomycin 10 mM al tampón de reacción para inhibir a la PP1 (Mitsuhashi y cols., 2001).

Tampón de reacción PTPs 5x (Jarvis y cols., 2006):

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

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. Se atempera la muestra a temperatura ambiente durante 2 min y se empieza la reacción añadiendo 35 µl de la muestra en el pocillo de reacción. Se deja incubar la reacción durante 15 min. La reacción se detiene añadiendo 50 µl de la solución de la sonda de molibdato (1 volumen de reacción).

Se coloca la placa de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 15 min (30 min si hay más de 5 µg 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.

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

2.18.3. Cálculos.

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.

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

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

2.19. Determinación de triglicéridos.

Los triglicéridos plasmáticos y del líquido ascítico fueron medidos utilizando el kit *Triglycerides-LQ*[®] (Spinreact, Girona, España).

2.19.1. Fundamento.

Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) por GPO.

Al final, el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja debido a la formación de una quinona. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada.

2.19.2. Procedimiento.

Las condiciones del ensayo son:

- Longitud de onda → 555 nm (530-580)
- Cubeta → 1 cm paso de luz
- Temperatura → 15-25°C

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se ajusta a cero el espectrofotómetro frente a agua destilada. Para determinar la concentración de triglicéridos se emplea el R1 del kit. Se pipetea en una cubeta 500 µl de R1 y 5 µl de muestra o patrón calibrador, se agitan, se incuban 10 min a 15-25°C y se lee la absorbancia.

2.19.3. Cálculos.

Una vez obtenidas las absorbancias se aplica la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{A}{A_{\text{Patrón}}}\right) \times \text{Concentración del patrón} = \text{mg/dL.}$$

2.20. Determinación de ácidos grasos libres.

Los ácidos grasos libres del plasma y del líquido ascítico se determinaron por el kit *Free Fatty Acid Quantification*[®] (Biovision, California, USA).

2.20.1. Fundamento.

Es un método colorimétrico basado en la formación enzimática del ácido graso en su derivado CoA. La posterior oxidación de este último generaría el color detectable por el espectrofotómetro.

2.20.2. Procedimiento.

La determinación se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante. Destacar que el líquido ascítico requiere una dilución 1/10 para entrar en el rango del kit.

La lectura se realizará a 570 nm.

2.20.3. Cálculos.

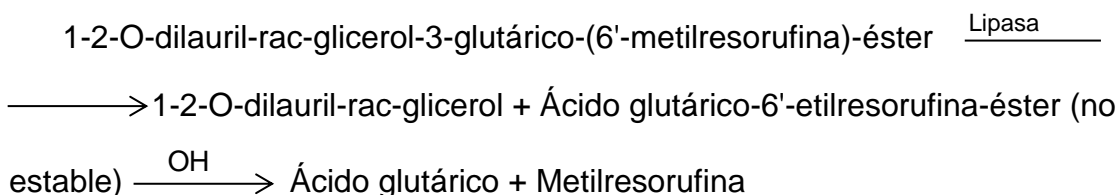
La concentración de AGL de las muestras se determina por comparación con una recta estándar de ácido palmítico. El rango de la recta oscila desde 0,02 hasta 2,5 µmol/ml de ácido palmítico.

2.21. Determinación cuantitativa de lipasa pancreática.

La cuantificación de la lipasa pancreática presente en el plasma, líquido ascítico y en el homogenado de tejido adiposo blanco y en el de necrosis grasa fue determinada mediante el kit *Lipase-LQ*[®] (Spinreact, Girona, España).

2.21.1. Fundamento.

La lipasa pancreática en presencia de colipasa, iones calcio y desoxicolato, hidroliza el sustrato 1-2-O-dilauril-rac-glicerol-3-glutárico-(6'-metilresorufina)-éster. Las secuencias de las reacciones para la determinación directa de la lipasa son las siguientes:



La velocidad de formación de metilresorufina determinada espectrofotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de lipasa en la muestra ensayada.

2.21.2. Procedimiento.

Las muestras de tejido adiposo abdominal y de necrosis grasa se homogenizan en tampón Kpi 50mM, EDTA 0,1 mM a pH 7,4 en proporción de 100 mg/ml.

Las condiciones del ensayo son:

- Longitud de onda → 580 nm
- Cubeta → 1 cm paso de luz
- Temperatura → 37°C

Para la realización de la técnica se dispone de dos reactivos:

- El R1, tampón Tris pH 8,3 que contiene colipasa, desoxicolato y taurodesoxicolato.
- El R2, tartrato a pH 4,0, sustrato de lipasa y cloruro cálcico (CaCl₂).

Ambos reactivos se incuban por separado a 37°C en baño termostatable. Para realizar la determinación se pipetea en la cubeta 500 µl del R1, 100 µl del R2 y 5 µl de muestra o calibrador. Se obtiene la absorbancia (A) inicial de la

muestra o del calibrador, y tras poner en marcha el cronómetro, se mide la absorbancia cada minuto durante 2 minutos. Se calcula el promedio del incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

En las muestras de plasma y líquido ascítico es necesaria una dilución 1/10 para asegurar la linealidad de la medida cinética.

2.21.3. Cálculos.

Se empleó un calibrador facilitado por el fabricante para conocer la actividad lipasa de las muestras. La medida viene determinada por la siguiente fórmula:

$$((\Delta A/\text{min}) \text{ muestra} / (\Delta A/\text{min}) \text{ calibrador}) \times \text{actividad calibrador} = U/L$$

Siendo la U, la cantidad de metilresorufina formada por la enzima.

2.22. Análisis estadístico.

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se lleva a cabo en dos pasos. En primer lugar, la media de los diferentes grupos se compara utilizando el análisis de la varianza. Cuando la comparación global entre grupos es significativa, la diferencia entre grupos individuales se determina aplicando la prueba de Scheffé, considerando que las diferencias son significativas para una $p < 0,05$ e indicando aquellos análisis en los que se otenga como resultado una $p < 0,01$.

IV-RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS LOCALES Y SISTÉMICOS DE LA HEMOGLOBINA DEL LÍQUIDO ASCÍTICO ASOCIADA A HEMÓLISIS EN RATAS WISTAR CON PANCREATITIS AGUDA.

1.1. Identificación de la hemoglobina extracelular en el líquido ascítico asociado a la pancreatitis aguda.

La identificación de hemoglobina extracelular en el líquido ascítico se llevó a cabo utilizando dos técnicas experimentales distintas.

La primera técnica consistió en la identificación de la hemoglobina mediante la realización de una electroforesis y posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa. En la membrana se detectó la actividad peroxidasa de las proteínas de la ascitis de ratas con pancreatitis aguda mediante comparación con patrones conocidos. Se observó un bandeo con actividad peroxidasa compatible con hemoglobina bovina pura comercial (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y con un lisado de glóbulos rojos de rata (Fig. 15).

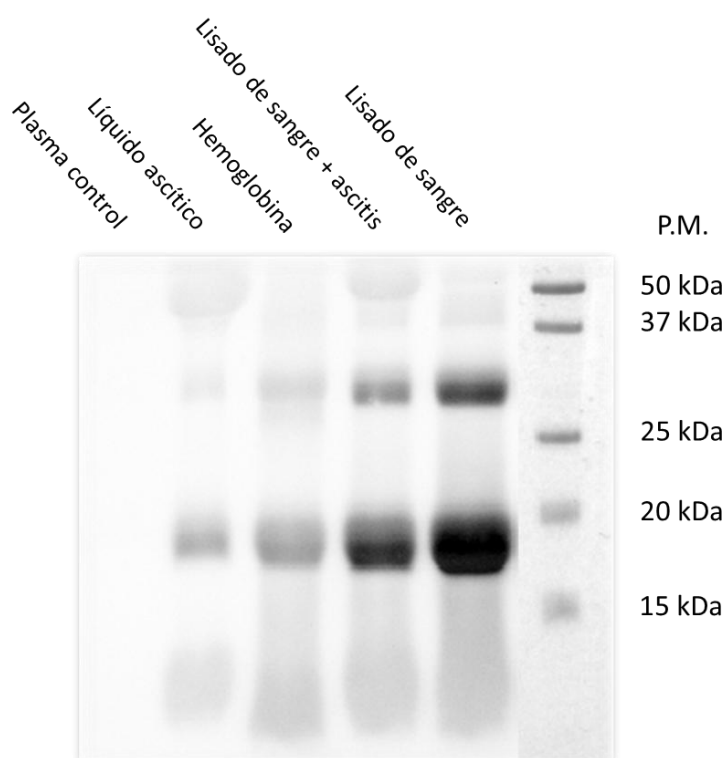


Figura 15.- Actividad peroxidasa del líquido ascítico asociado a pancreatitis aguda. *Western Blot* representativo de la actividad peroxidasa del líquido ascítico extraído de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda, frente a plasma de rata con pancreatitis aguda, hemoglobina bovina pura comercial, lisado de sangre de rata mezclado con la ascitis y lisado de sangre de rata.

La segunda técnica de identificación se realizó mediante la obtención de la banda candidata con capacidad peroxidasa tras electroforesis y posterior identificación por la técnica de MALDI-TOF, como se describe en el apartado correspondiente de Material y Métodos (apartado 2.5.). Los análisis nos confirmaron la presencia de la subunidad beta de la globina en la ascitis con un score MASCOT de 170, teniendo en cuenta que scores mayores a 51 presentan una significancia de $p < 0,05$.

1.2. Efecto hemolítico del líquido ascítico sobre sangre.

Los resultados obtenidos indicaban la existencia de hemoglobina extracelular en el líquido ascítico. A continuación, nos propusimos averiguar si el origen de la hemoglobina estaba relacionado con la posible capacidad hemolítica del líquido ascítico.

Para llevar a cabo este ensayo se incubaron eritrocitos procedentes de la centrifugación de sangre de rata con pancreatitis aguda, con su propio plasma (control negativo), su propia ascitis y su propia ascitis con inhibidores de proteasas. El control positivo consistió en la lisis de esos mismos eritrocitos mediante sonicación y posterior centrifugación.

En la figura 16 se observa el porcentaje de lisis conseguido en la ascitis frente al control positivo (lisado de glóbulos rojos), datos que corroboran el origen hemolítico de la hemoglobina identificada en el líquido ascítico.

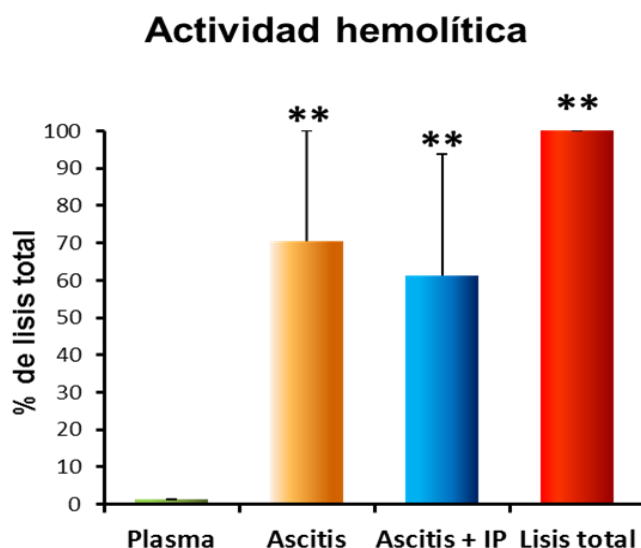


Figura 16.- Efecto hemolítico del líquido ascítico sobre glóbulos rojos. Porcentaje de lisis relativo a un lisado de glóbulos rojos, obtenido tras la incubación de eritrocitos de rata con plasma, ascitis y ascitis más inhibidores de proteasas. La diferencia estadística se indica como sigue: ** $P < 0.01$ vs. control negativo (plasma).

1.3. Evolución de los niveles de hemoglobina extracelular y de bilirrubina total en líquido ascítico y plasma de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda.

Una vez identificada la presencia de hemoglobina extracelular en el líquido ascítico y su origen hemolítico, nos propusimos conocer su concentración en el transcurso de la pancreatitis aguda a diferentes tiempos, tanto en ascitis como en plasma. Acompañando a este resultado, se determinaron los valores de bilirrubina total, producto resultante del metabolismo de la hemoglobina.

La figura 17A muestra los niveles de hemoglobina extracelular en el líquido ascítico de ratas sacrificadas a 0, 0.5, 1, 3, 6 y 24 horas tras inducción de pancreatitis aguda necrótica. Desde estadios iniciales de la enfermedad, la hemoglobina es detectable en el líquido ascítico, alcanzando su máxima concentración a la hora de la inducción ($4,10 \pm 1,4$ mg/ml). Posteriormente, estos niveles se redujeron significativamente hasta alcanzar a las 24 horas un valor de $0,98 \pm 0,15$ mg/ml.

Líquido ascítico

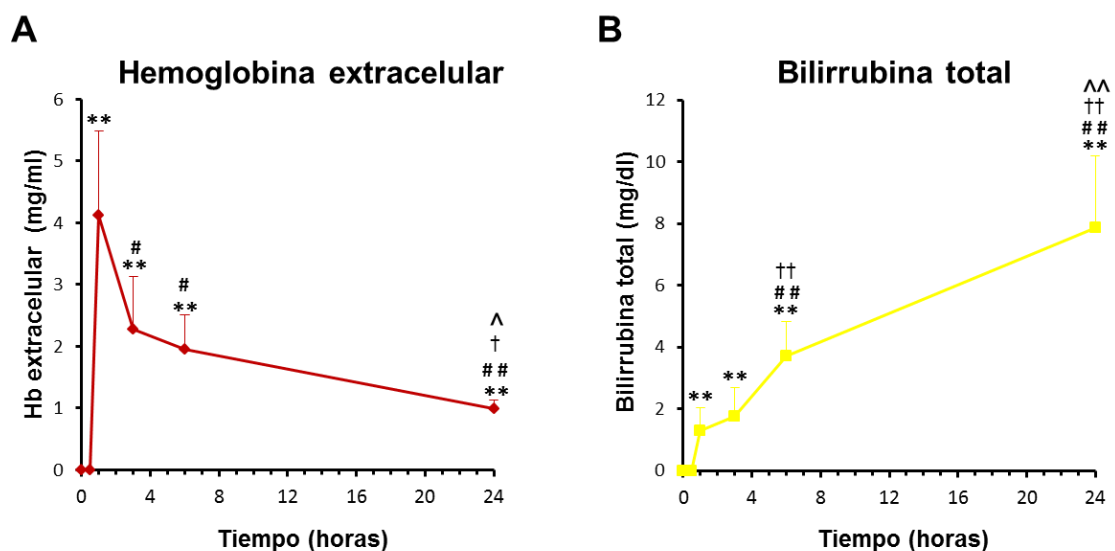


Figura 17.- Evolución de los niveles de hemoglobina extracelular y bilirrubina total en líquido ascítico en la pancreatitis aguda. Concentración de hemoglobina extracelular (A) y de bilirrubina total (B) en ascitis de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda a 0, 0.5, 1, 3, 6 y 24 horas tras la inducción de pancreatitis con taurocolato. La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control y 0,5 horas. # P < 0.05 vs. 1 hora. ## P < 0.01 vs. 1 hora. †P < 0.05 vs. 3 horas. ††P < 0.01 vs. 3 horas. ^P < 0.05 vs. 6 horas. ^^P < 0.01 vs. 6 horas.

En base a estos resultados, se determinó la concentración de bilirrubina total en el líquido ascítico. Los valores de este pigmento, procedente del metabolismo del grupo hemo, experimentan un aumento progresivo en la ascitis de los animales durante la evolución de la pancreatitis aguda, alcanzando su máximo a las 24 horas de la inducción de la enfermedad con taurocolato sódico (8 ± 2 mg/dl) (Fig. 17B).

De la misma forma, nos planteamos realizar las determinaciones en el plasma de las ratas con pancreatitis. Los niveles de hemoglobina extracelular aumentaron tras la inducción de la pancreatitis hasta alcanzar un valor máximo, manteniéndose este valor de hemoglobina extracelular durante el transcurso de la PA en las primeras 24 horas. Destacar que la concentración más elevada se determinó a las 6 horas de la inducción ($2,0 \pm 1,0$ mg/ml), frente a 1 hora que aparecía en ascitis. La cifra de hemoglobina libre obtenida a las 24 horas ($1,67 \pm 0,15$ mg/ml) continuó siendo significativamente mayor respecto al grupo control de 0 horas ($0,73 \pm 0,11$ mg/ml) (Fig. 18A).

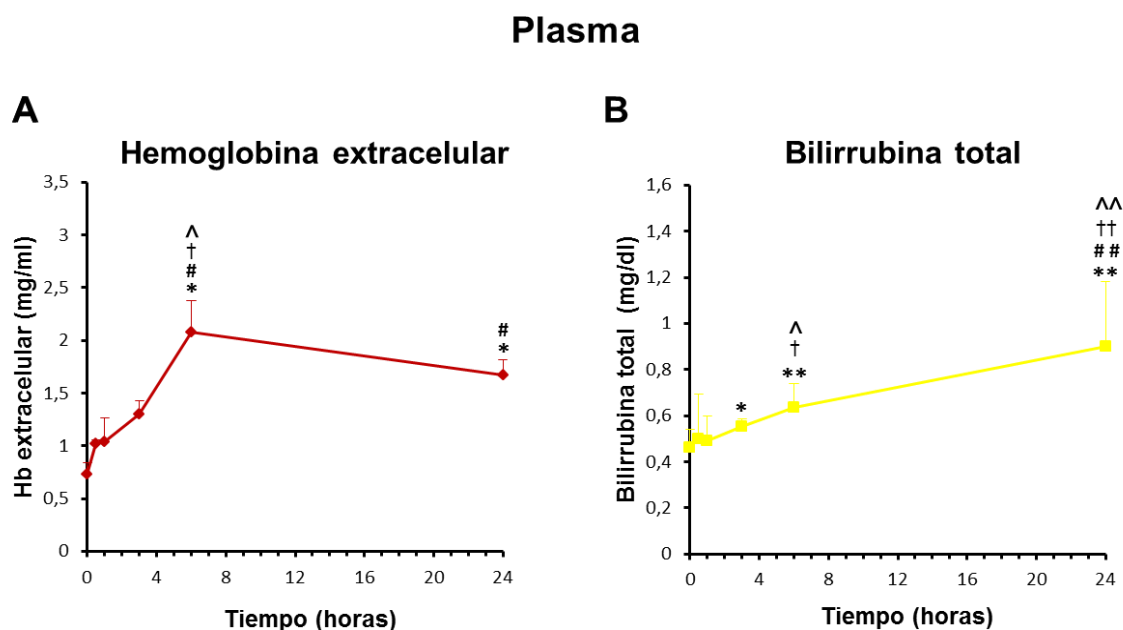


Figura 18.- Evolución de los niveles de hemoglobina extracelular y bilirrubina total en plasma en la pancreatitis aguda. Concentración de hemoglobina extracelular (A) y de bilirrubina total (B) en plasma de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda a 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 horas tras la inducción de pancreatitis con taurocolato. La diferencia estadística se indica como sigue: * P < 0.05 vs. tiempo "0" o control. ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. # P < 0.05 vs. 0,5 horas. ## P < 0.01 vs. 0,5 horas. †P < 0.05 vs. 1 horas. ††P < 0.01 vs. 1 horas. ^P < 0.05 vs. 3 horas. ^^P < 0.01 vs. 3 horas.

Respecto a la bilirrubina total plasmática, la evolución de los valores siguió el mismo patrón que el hallado en el líquido ascítico, aunque con niveles marcadamente menores. Aumento de la concentración plasmática desde tiempos muy tempranos, haciéndose significativa a partir de las 3 horas respecto al grupo control. La máxima concentración se encontró a las 24 horas del comienzo de la pancreatitis ($0,9 \pm 0,3$ mg/dl), como sucedía en el líquido ascítico (Fig. 18B).

1.4. Actividad peroxidasa en líquido ascítico y plasma tras inducción de pancreatitis aguda.

A continuación, y una vez observada la presencia de hemoglobina extracelular en el líquido ascítico y en el plasma, decidimos comprobar si esta presencia se acompañaba de actividad peroxidasa en ambos líquidos corporales.

En primer lugar, se analizó la actividad peroxidasa en el líquido ascítico. En la figura 19A se observa como la actividad peroxidasa aumentó rápidamente, alcanzándose el máximo a la hora de la inducción (17 ± 7 mU/mg proteína). A continuación, la actividad descendió progresivamente de forma similar al perfil de la hemoglobina extracelular comentado en la figura 17A.

En lo referente al plasma, la actividad peroxidasa aumentó paulatinamente hasta alcanzar el máximo de actividad a las 6 horas de la inducción de la pancreatitis ($0,42 \pm 0,04$ mU/mg proteína). A partir de este punto se produce un descenso progresivo de la actividad, relacionado con la evolución de la concentración de hemoglobina extracelular plasmática mostrada anteriormente en la figura 18A (Fig. 19B).

Actividad peroxidasa

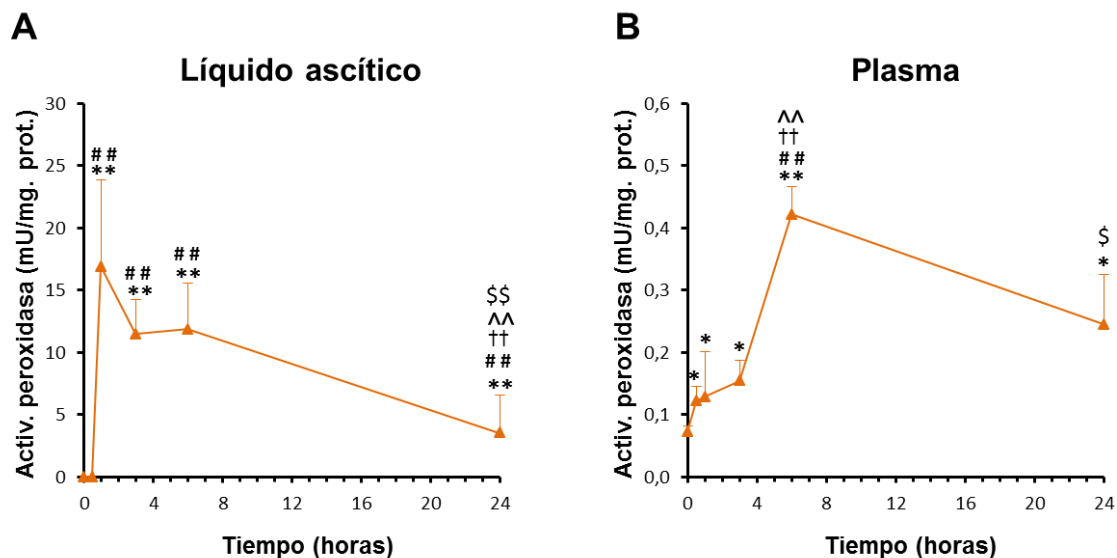


Figura 19.- Evolución de la actividad peroxidasa en líquido ascítico y plasma en la pancreatitis aguda. Actividad peroxidasa en ascitis (A) y plasma (B) de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda a 0, 0.5, 1, 3, 6 y 24 horas tras la inducción de pancreatitis con taurocolato. La diferencia estadística se indica como sigue: * $P < 0.05$ vs. tiempo "0" o control. ** $P < 0.01$ vs. tiempo "0" o control. ## $P < 0.01$ vs. 0,5 horas. †† $P < 0.01$ vs. 1 horas. ^^ $P < 0.01$ vs. 3 horas. \$ $P < 0.05$ vs. 6 horas. \$\$ $P < 0.01$ vs. 6 horas.

1.5. Efecto de la hemoglobina extracelular sobre la formación de necrosis grasa y líquido ascítico en la pancreatitis aguda experimental necrotizante.

En base a todos estos resultados, el estudio se centró en el papel que podría desempeñar la hemoglobina presente en el líquido ascítico en la evolución local y sistémica de la pancreatitis aguda.

En primer lugar se analizó la necrosis grasa. La cantidad de necrosis presente en la grasa abdominal durante la pancreatitis fue valorada por el número de focos de necrosis grasa. En la figura 20A observamos como la formación de estos focos de necrosis grasa aumenta considerablemente tras la inyección intraperitoneal de hemoglobina en ratas con pancreatitis aguda, del orden de cinco veces más respecto al grupo de pancreatitis aguda sin adición de hemoglobina en el líquido ascítico a las 6 horas de la inducción de la enfermedad.

Acompañando a este resultado, también se cuantificó el volumen de líquido ascítico generado. Como ocurría con la formación de necrosis grasa, la administración de hemoglobina en ratas *Wistar* con pancreatitis aguda provocó

un aumento significativo en la producción de ascitis respecto al grupo de animales con pancreatitis aguda (Fig. 20B).

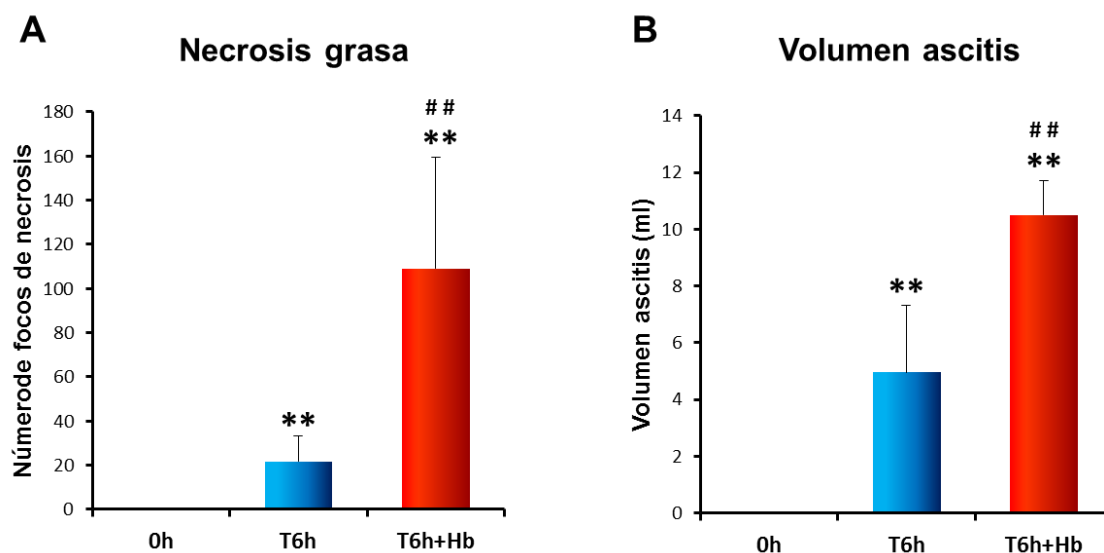


Figura 20.- Cuantificación macroscópica de necrosis grasa y volumen ascítico en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Número de focos de necrosis grasa (A) y volumen ascítico (B) en ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. ## P < 0.01 vs. T6h.

1.6. Concentración de hemoglobina extracelular y actividad peroxidasa en líquido ascítico de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda y tras administración de hemoglobina.

La inyección intraperitoneal de hemoglobina libre, en ratas con pancreatitis aguda, produjo un aumento significativo de la concentración de la misma en el líquido ascítico de este grupo experimental respecto al grupo de ratas *Wistar* con PA a las 6 horas de la inducción (Fig. 21A).

Como era de esperar, el aumento observado en los niveles de hemoglobina extracelular en el líquido ascítico de estos animales se acompañó de un incremento en la actividad peroxidasa (Fig. 21B).

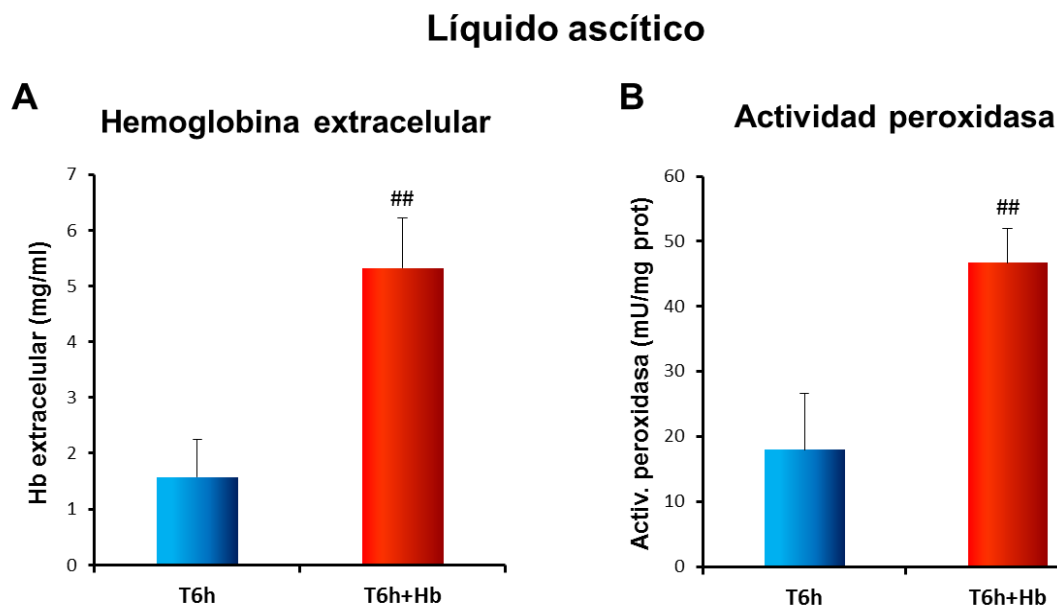


Figura 21.- Concentración de hemoglobina extracelular y actividad peroxidasa en el líquido ascítico en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Concentración de hemoglobina extracelular (A) y actividad peroxidasa (B) en el líquido ascítico de ratas *Wistar* a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: ## $P < 0.01$ vs. T6h.

1.7. Determinación de la concentración de hemoglobina extracelular y bilirrubina total y directa en plasma tras la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina.

Tras el análisis del líquido ascítico en los animales con PA, nos planteamos determinar la concentración plasmática de hemoglobina extracelular y de bilirrubina tras la administración intraperitoneal de hemoglobina en la pancreatitis aguda experimental.

La concentración de hemoglobina extracelular plasmática aumentó de manera significativa a las 6 horas tras la inducción de pancreatitis. La inyección de hemoglobina en la cavidad peritoneal también produjo una elevación significativa en los valores plasmáticos respecto al grupo control y al grupo de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda (Fig. 22A).

Respecto a la bilirrubina, se obtuvo el mismo perfil que se observó con la hemoglobina extracelular. La bilirrubina directa o conjugada aumentó en el

transcurso de la pancreatitis aguda, si lo comparamos con el grupo control, y sus niveles se elevaron si además inyectamos intraperitonealmente hemoglobina (Fig. 22C). Los valores de bilirrubina total se comportan igual que los de bilirrubina directa o conjugada (Fig. 22B).

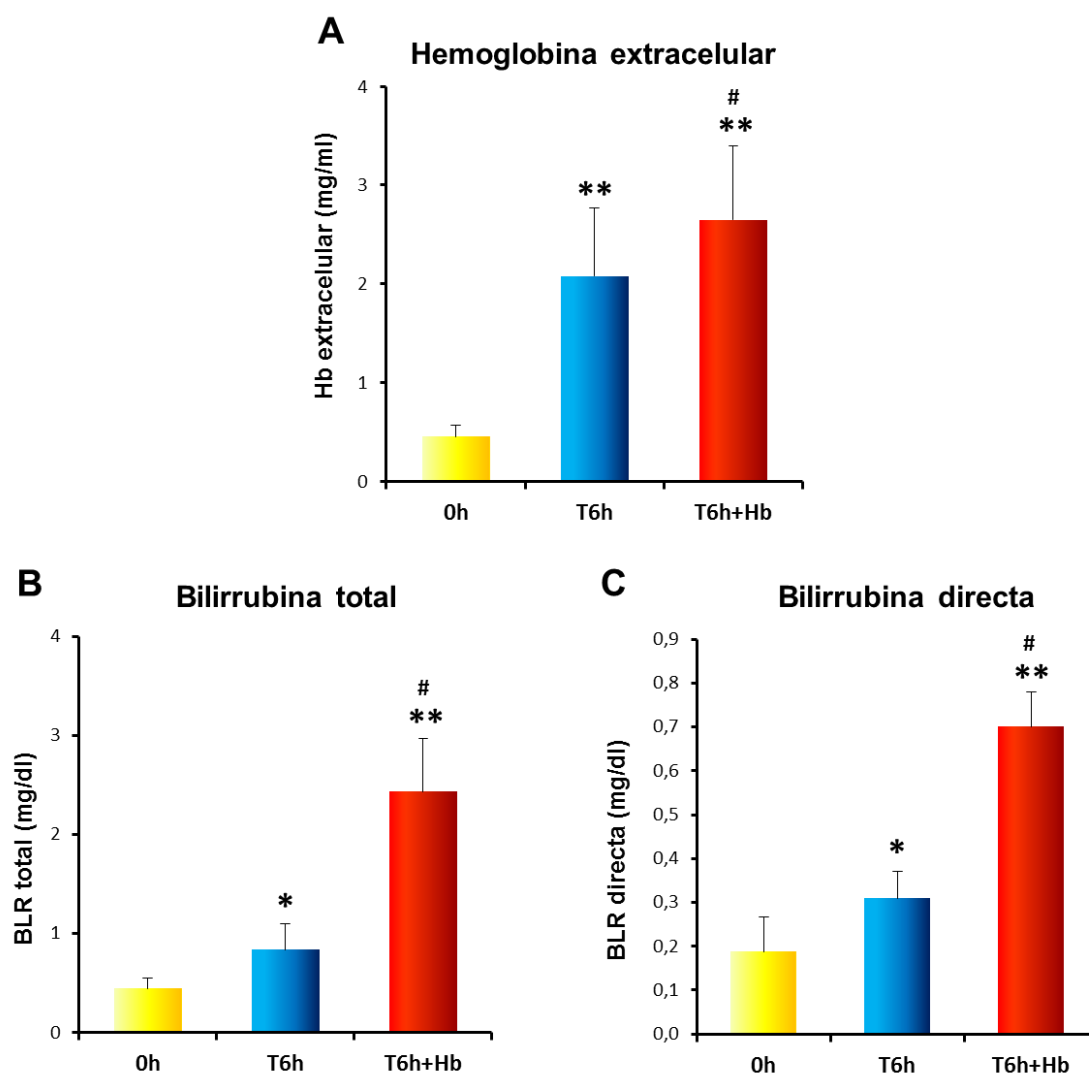


Figura 22.- Concentración plasmática de hemoglobina extracelular, bilirrubina total y bilirrubina directa en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Concentración de hemoglobina extracelular (A), bilirrubina total (B) y bilirrubina directa (C) en plasma de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: * $P < 0.05$ vs. tiempo "0" o control. ** $P < 0.01$ vs. tiempo "0" o control. # $P < 0.05$ vs. T6h.

1.8. Niveles plasmáticos de malondialdehído e isoprostanos en pancreatitis aguda y tras inyección intraperitoneal de hemoglobina.

A continuación, nos propusimos determinar las concentraciones plasmáticas de dos productos de peroxidación lipídica *in vivo*, el malondialdehído (MDA) y uno de los isoprostanos más representativos debido a sus propiedades vasoactivas, el 15-isoprostano F_{2t}.

Los niveles plasmáticos de MDA e isoprostanos presentaron una tendencia, no significativa, hacia una elevación a las 6 horas de la inducción de la pancreatitis aguda. No obstante, tras la administración intraperitoneal de hemoglobina, tanto los valores de MDA como los de isoprostanos aumentaron significativamente respecto al grupo control y respecto al grupo de pancreatitis aguda (Fig. 23).

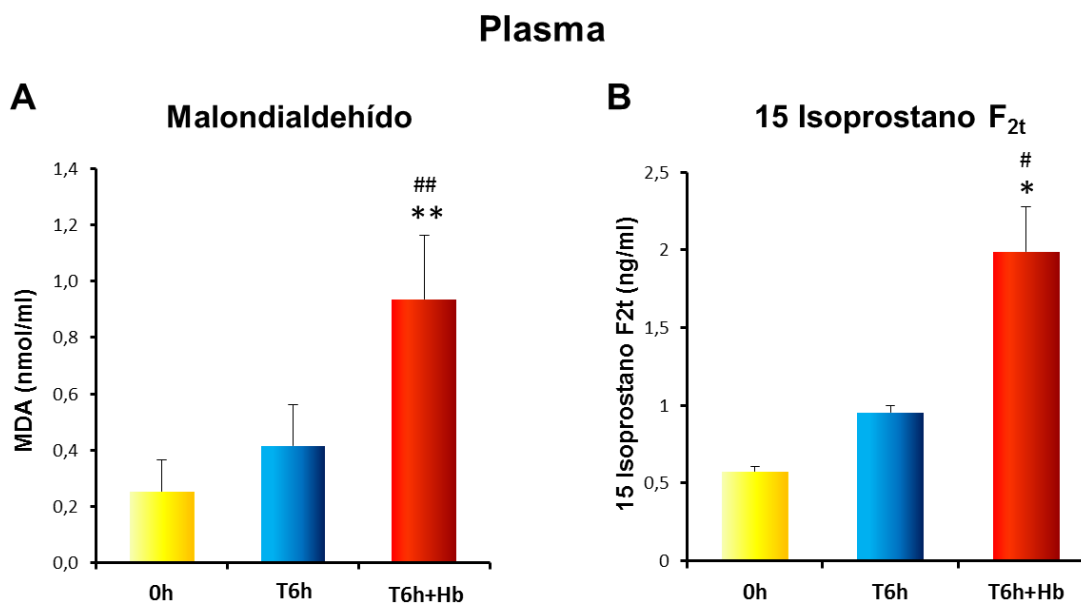


Figura 23.- Concentración plasmática de malondialdehído y 15-isoprostano F_{2t} en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Determinación de la concentración plasmática de malondialdehído (A) y 15-isoprostano F_{2t} (B) en ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: * P < 0.05 vs. tiempo "0" o control. ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. # P < 0.05 vs. T6h. ## P < 0.01 vs. T6h.

1.9. Papel de la hemoglobina administrada intraperitonealmente sobre los niveles de glutatión reducido en páncreas, tejido adiposo abdominal, hígado y pulmón en ratas *Wistar* con pancreatitis aguda.

Los resultados de peroxidación lipídica obtenidos en el plasma nos indujeron a estudiar la influencia que podía tener la hemoglobina extracelular en el estado oxidativo de distintos órganos implicados tanto en el daño local pancreático como en el fallo multiorgánico asociado a la pancreatitis aguda.

En primer lugar, decidimos analizar los valores de glutatión reducido (GSH) en el propio tejido pancreático. Tras la inducción de pancreatitis aguda se observó depleción significativa en los niveles de GSH, esta disminución se mantuvo en el mismo rango tras la administración de hemoglobina en la cavidad peritoneal (Fig. 24A).

A continuación, se determinó la concentración de GSH en el tejido adiposo abdominal, tejido en contacto con el líquido ascítico y afectado por la presencia de hemoglobina libre, como observamos al cuantificar el número de áreas de necrosis grasa (Fig. 20A). Como ocurrió en el tejido pancreático, los niveles de GSH descendieron de manera significativa en los animales con pancreatitis aguda. Tras la inyección de hemoglobina no observamos cambios significativos en la depleción de GSH respecto al grupo de pancreatitis (Fig. 24B).

Para finalizar con el estudio de los tejidos en contacto con el líquido ascítico se analizó el hígado, órgano además implicado en el metabolismo de la hemoglobina. La pancreatitis aguda ocasiona disminución en los valores de GSH. Resaltar que a diferencia del páncreas y del tejido adiposo abdominal, la adición de hemoglobina en la ascitis sí produce un descenso significativo en la concentración de GSH en el tejido hepático (Fig. 24C).

Por último, se analizó el pulmón, órgano situado fuera de la cavidad abdominal. Aunque este órgano no está en contacto con el líquido ascítico, sí está implicado en el fallo multiorgánico asociado a la pancreatitis aguda. Los niveles de GSH no sufrieron modificaciones significativas en ninguna de las condiciones estudiadas (Fig. 24D).

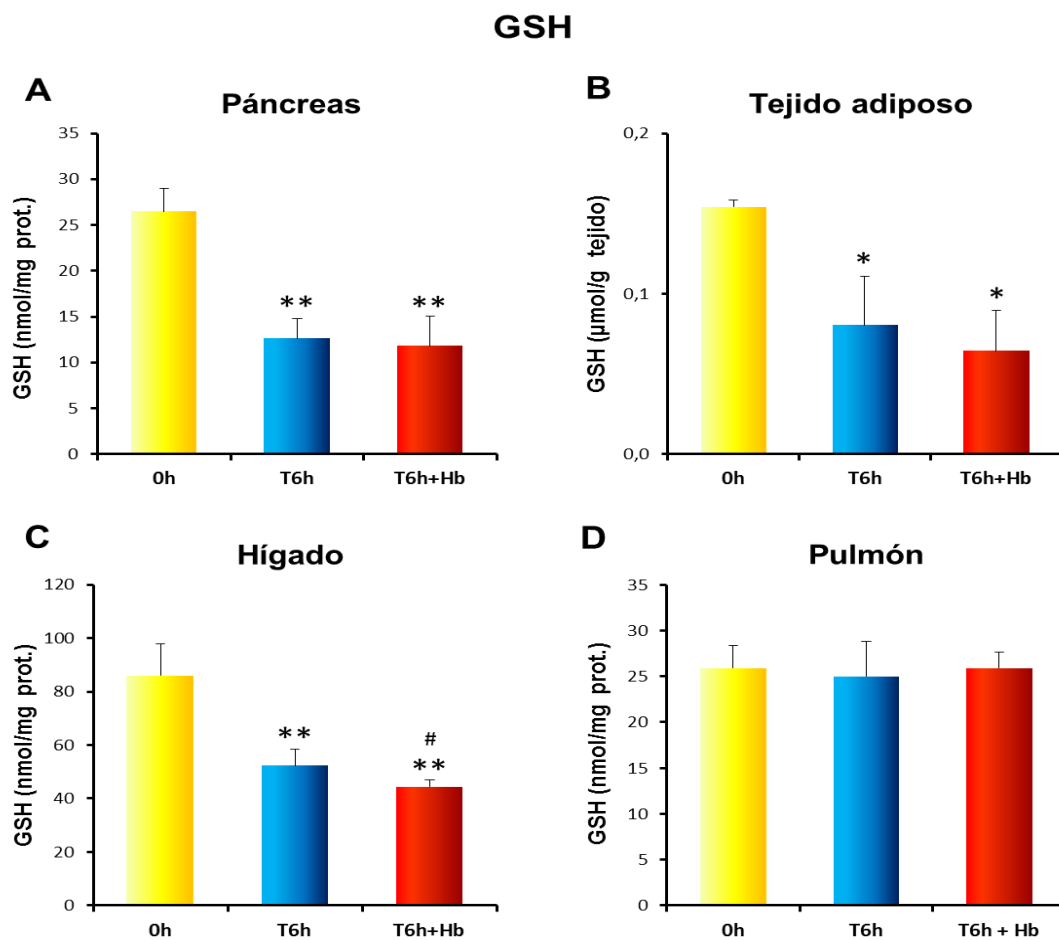


Figura 24.- Niveles de glutatión reducido (GSH) en tejido pancreático, tejido adiposo, tejido hepático y tejido pulmonar en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Concentración de GSH en homogenado de páncreas (A), de tejido adiposo abdominal (B), de hígado (C) y de pulmón (D) de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: * $P < 0.05$ vs. tiempo "0" o control. ** $P < 0.01$ vs. tiempo "0" o control. # $P < 0.05$ vs. T6h.

1.10. Expresión de genes implicados en la inflamación en el páncreas de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda tras administración de hemoglobina extracelular.

A continuación del estudio del glutatión reducido en páncreas, se analizó la afectación inflamatoria del tejido pancreático tras el tratamiento con hemoglobina. Se analizó la expresión transcripcional de dos enzimas relacionadas con la inflamación, la óxido nítrico sintasa inducible (*inos*) y la hemo oxigenasa 1 (*ho-1*), esta última también implicada en el metabolismo de la hemoglobina, y de las interleuquinas 1 β , 6 y 10.

La figura 25 muestra un aumento muy marcado en la expresión de los mensajeros de ambas enzimas en el tejido pancreático tras la inducción de la pancreatitis aguda. La administración de hemoglobina libre en el líquido ascítico no produce ningún incremento adicional de la expresión de *inos* y de *ho-1* en el páncreas en la pancreatitis aguda.

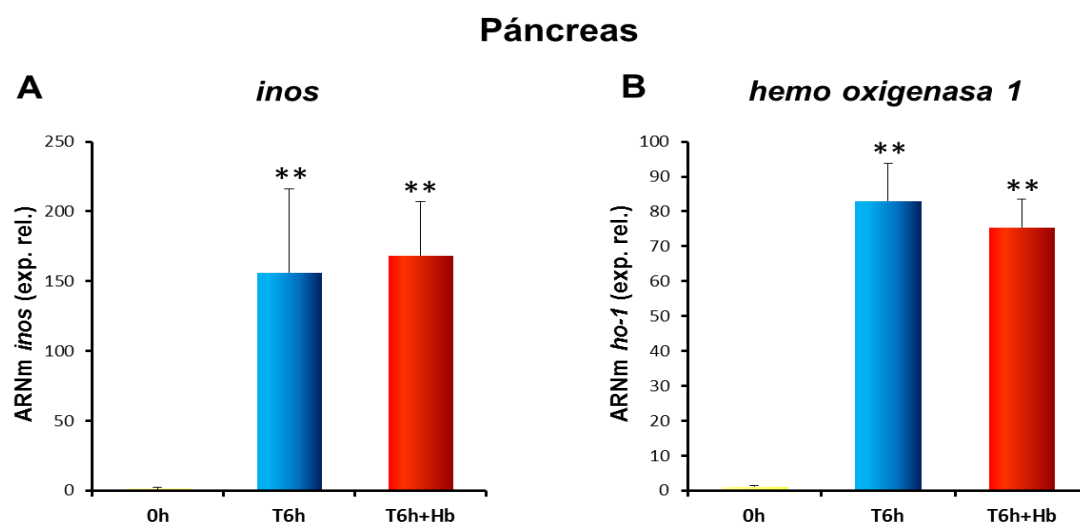


Figura 25.- Expresión de ARNm de *inos* y de *ho-1* en páncreas en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Niveles relativos de ARNm de *inos* (A) y de *ho-1* (B) vs. *rplp0* en tejido pancreático de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control.

En cuanto al análisis de la citoquinas, los resultados obtenidos fueron diversos. Observando los niveles de expresión relativa de la *il-1β*, apreciamos un aumento transcripcional significativo transcurridas 6 horas desde la inducción de la pancreatitis. Tras la adición de hemoglobina, los niveles expresados no sufrieron un cambio significativo (Fig. 26A). El resultado más destacable es el que nos ofrece el estudio de la *il-6*. Tras la inducción de la patología, los niveles de ARNm alcanzaron valores muy elevados comparados con las otras dos citoquinas analizadas. Los niveles de expresión siguieron aumentando tras la administración de la hemoglobina libre en el abdomen de las ratas *Wistar* con pancreatitis (Fig. 26B). Por último, se estudió la expresión de una citoquina antiinflamatoria, la *il-10*. La expresión relativa de ARNm aumentó en pancreatitis aguda, probablemente como mecanismo de defensa en el proceso inflamatorio de la pancreatitis. La hemoglobina libre del líquido ascítico no parece estar involucrada en la regulación génica de esta citoquina, como ocurría con la *il-1β* (Fig. 26C).

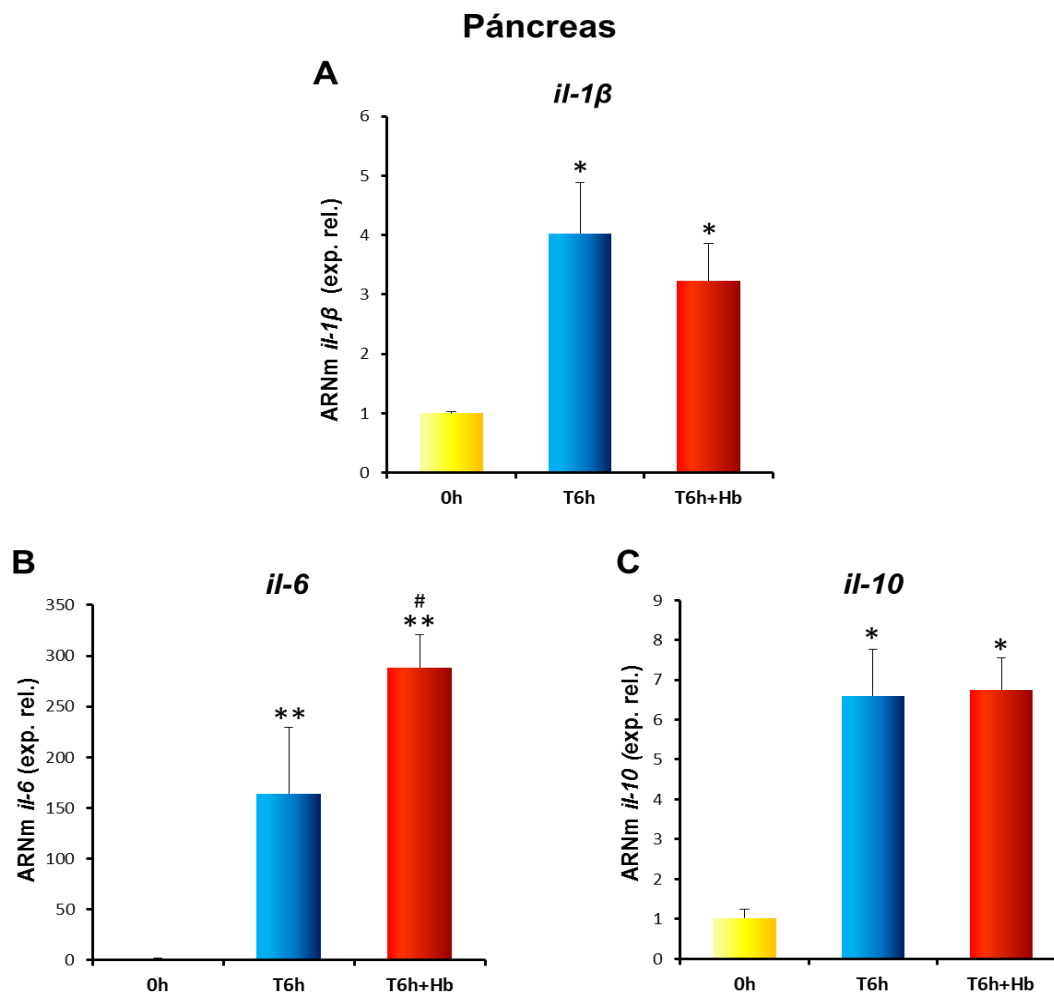


Figura 26.- Expresión de ARNm de *il-1 β* , *il-6* e *il-10* en páncreas en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Niveles relativos de ARNm de *il-1 β* (A), *il-6* (B) e *il-10* (C) vs. *rplp0* en tejido pancreático de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: * $P < 0.05$ vs. tiempo "0" o control. ** $P < 0.01$ vs. tiempo "0" o control. # $P < 0.05$ vs. T6h.

1.11. Papel de la hemoglobina extracelular en la regulación transcripcional de genes relacionados con la inflamación en el tejido adiposo abdominal de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda.

Con el fin de determinar si la hemoglobina extracelular presente en el líquido ascítico podía desempeñar un papel importante en la formación de las áreas necróticas observadas en el tejido adiposo abdominal, se estudió la expresión de los ARNm de genes relacionados con la inflamación.

De igual forma que en el tejido pancreático, se comenzó el estudio analizando la expresión del gen *inos*. La inducción de la pancreatitis provocó un aumento muy marcado, casi 90 veces, en la expresión de este gen en el tejido adiposo. Como observábamos en el tejido pancreático, la administración de hemoglobina libre no varía la expresión de este gen (Fig. 27A).

Posteriormente, se midieron los niveles de expresión génica de la *ho-1*. De nuevo observamos un aumento marcado, más de 40 veces, de su expresión en la pancreatitis aguda. A diferencia de lo sucedido en el páncreas, los valores del ARNm siguieron elevándose hasta aumentar 80 veces al inyectar la hemoglobina intraperitonealmente (Fig. 27B).

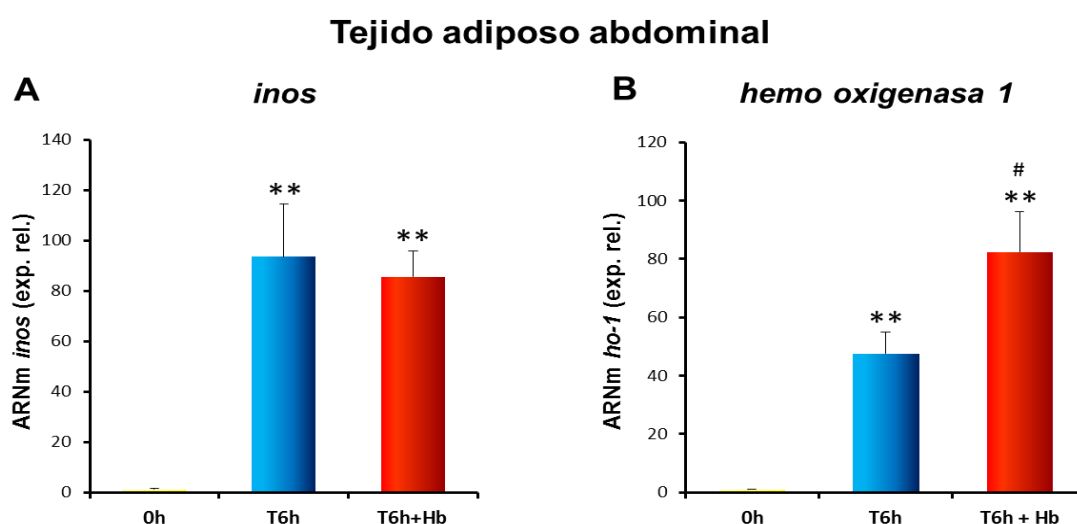


Figura 27.- Expresión de ARNm de *inos* y de *ho-1* en tejido adiposo abdominal en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Niveles relativos de ARNm de *inos* (A) y de *ho-1* (B) vs. *rplp0* en tejido adiposo abdominal de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. # P < 0.05 vs. T6h.

En la figura 28 se muestra el análisis de la expresión génica, a nivel de citoquinas claves en la regulación de la cascada inflamatoria, en la grasa abdominal en la pancreatitis aguda. Para ello, estudiamos la transcripción de las citoquinas *tnf- α* , *il-1 β* , *il-6* e *il-10*. Los valores de expresión de todas ellas aumentaron de manera significativa tras la inducción de la pancreatitis aguda. Cabe resaltar que los valores de *il-6* en condiciones basales fueron indetectables. Los datos más interesantes se obtuvieron tras la inyección de hemoglobina en la cavidad abdominal durante la pancreatitis, puesto que los niveles de ARNm de las tres citoquinas pro-inflamatorias, *tnf- α* , *il-1 β* e *il-6*,

aumentaron significativamente en este grupo experimental. En cambio, la expresión del ARNm de la *il-10*, citoquina antiinflamatoria, disminuyó significativamente respecto al grupo de 6 horas, poniendo de manifiesto la influencia de la hemoglobina libre en la regulación de la expresión génica de las citoquinas inflamatorias en el tejido adiposo y su posible relación con la formación de las áreas de necrosis grasa observadas en la figura 20.

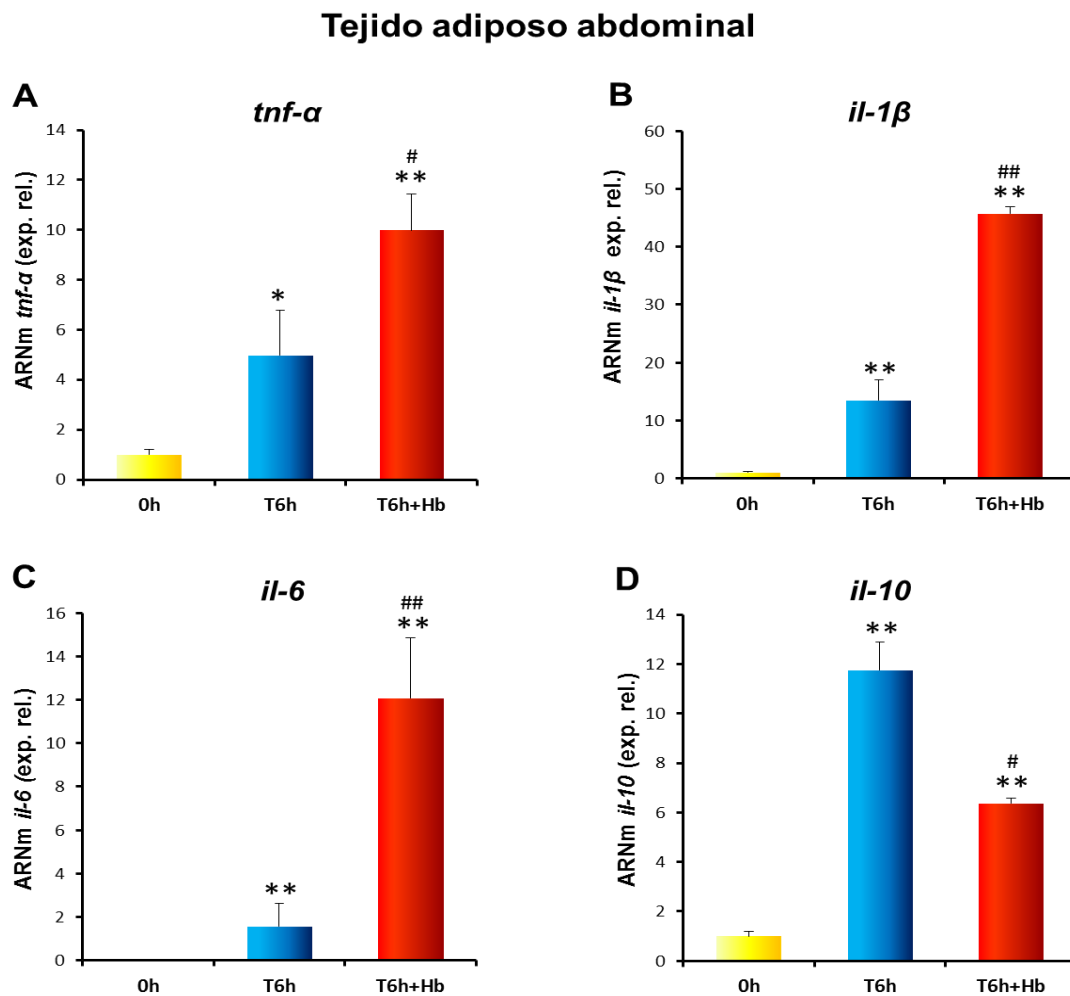


Figura 28.- Expresión de ARNm de *tnf-α*, *il-1β*, *il-6* e *il-10* en tejido adiposo abdominal en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Niveles relativos de ARNm de *tnf-α* (A), *il-1β* (B), *il-6* (C) e *il-10* (D) vs. *rplp0* en tejido adiposo abdominal de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: * P < 0.05 vs. tiempo "0" o control. ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. # P < 0.05 vs. T6h. ## P < 0.01 vs. T6h

1.12. Estudio de la transcripción de genes relacionados con la inflamación en hígado en la pancreatitis aguda tras administración de hemoglobina extracelular.

El estudio de la regulación transcripcional de genes relacionados con la inflamación a nivel sistémico, en pancreatitis aguda y en presencia de hemoglobina, continuó con el análisis del tejido hepático. Como hasta ahora, los dos primeros genes examinados fueron *inos* y *ho-1*. El comportamiento de la expresión del ARNm de *inos* fue el mismo que el observado en páncreas y tejido adiposo, que corresponde a un aumento significativo en la pancreatitis aguda, pero sin influencia de la administración de hemoglobina en la regulación génica (Fig 29A). Respecto a la otra enzima relacionada con la inflamación y con el metabolismo de la hemoglobina, *ho-1*, ésta experimentó el mismo perfil detallado anteriormente en el tejido adiposo. La inducción de la pancreatitis origina una elevación en la transcripción respecto a las condiciones basales. Tras la inyección de hemoglobina, la expresión de *ho-1* aumentó casi 30 veces respecto al grupo control y aproximadamente al doble respecto grupo de 6 horas (Fig. 29B).

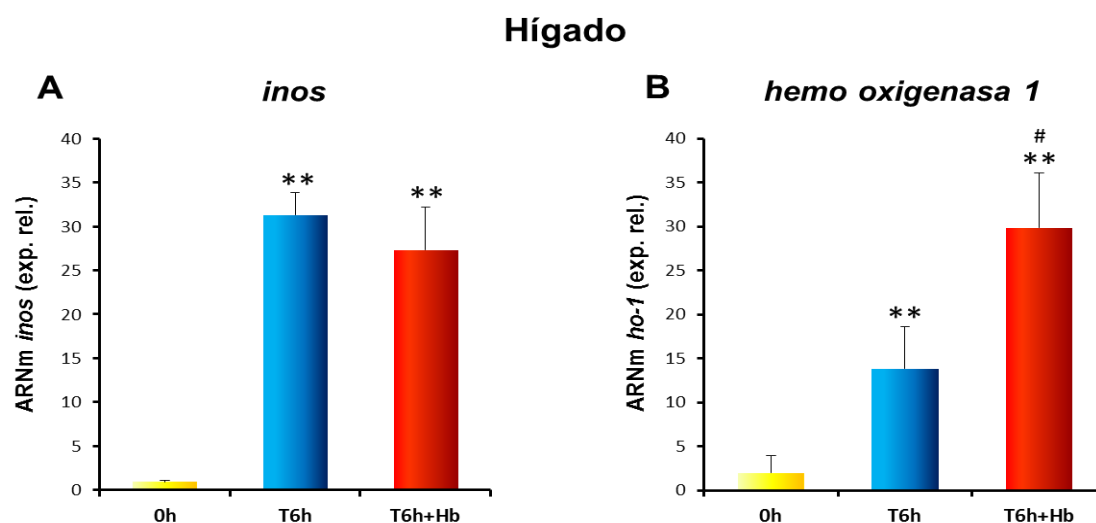


Figura 29.- Expresión de ARNm de *inos* y de *ho-1* en hígado en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Niveles relativos de ARNm de *inos* (A) y de *ho-1* (B) vs. *rplp0* en tejido hepático de ratas Wistar a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. # P < 0.05 vs. T6h.

A continuación, comparamos los niveles de ARNm en hígado de las citoquinas inflamatorias en las distintas condiciones experimentales. La figura 30 muestra que la pancreatitis aguda no influye en la regulación génica de estas citoquinas en el tejido hepático, ni tampoco la adición de hemoglobina extracelular.

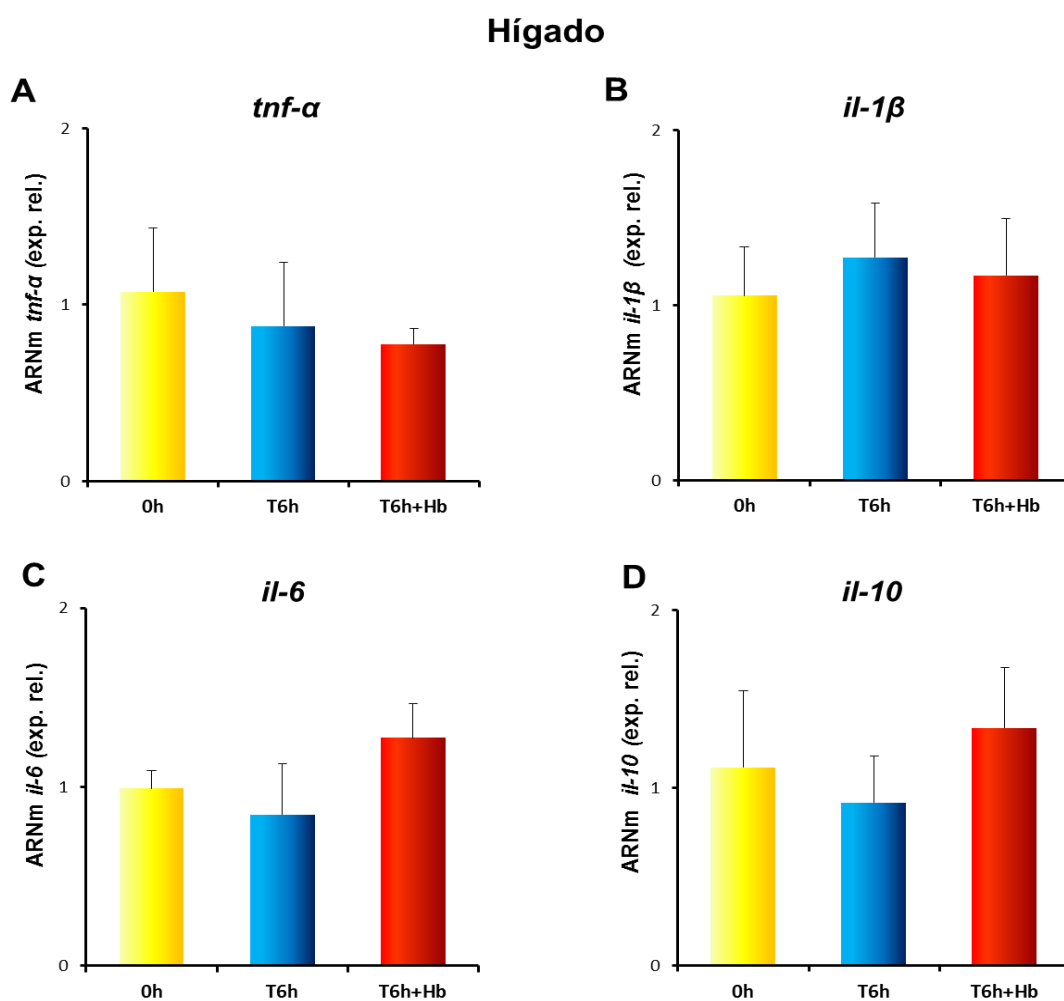


Figura 30.- Expresión de ARNm de *tnf-a*, *il-1β*, *il-6* e *il-10* en hígado en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Niveles relativos de ARNm de *tnf-a* (A), *il-1β* (B), *il-6* (C) e *il-10* (D) vs. *rplp0* en tejido hepático de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb).

1.13. Análisis en el tejido pulmonar de genes relacionados con la inflamación en la pancreatitis aguda tras administración de hemoglobina extracelular.

Para finalizar con el estudio sistémico de los genes implicados en la inflamación, escogimos un órgano afectado en la evolución de la pancreatitis aguda, el pulmón.

En primer lugar, observamos un marcado aumento de la expresión génica de *inos* tras la inducción de la pancreatitis, resultado que coincide con los obtenidos hasta ahora en otros tejidos. No obstante, el dato más relevante, respecto a los otros tejidos comparados, se obtuvo al inyectar la hemoglobina libre en la cavidad peritoneal. Aun siendo un órgano que no se encuentra en contacto directo con el líquido ascítico, la expresión génica de la *inos* aumentó significativamente respecto al grupo de pancreatitis aguda de 6 horas (Fig. 31A).

Respecto a la expresión génica de *ho-1*, el perfil obtenido coincide con el observado en tejido adiposo e hígado, que corresponde a niveles aumentados a las 6 horas de pancreatitis e incremento todavía mayor tras inyectar hemoglobina extracelular en la ascitis. Es destacable que los niveles de expresión de *ho-1* alcanzados en el pulmón no fueron tan elevados como los hallados en los otros tejidos (Fig. 31B).

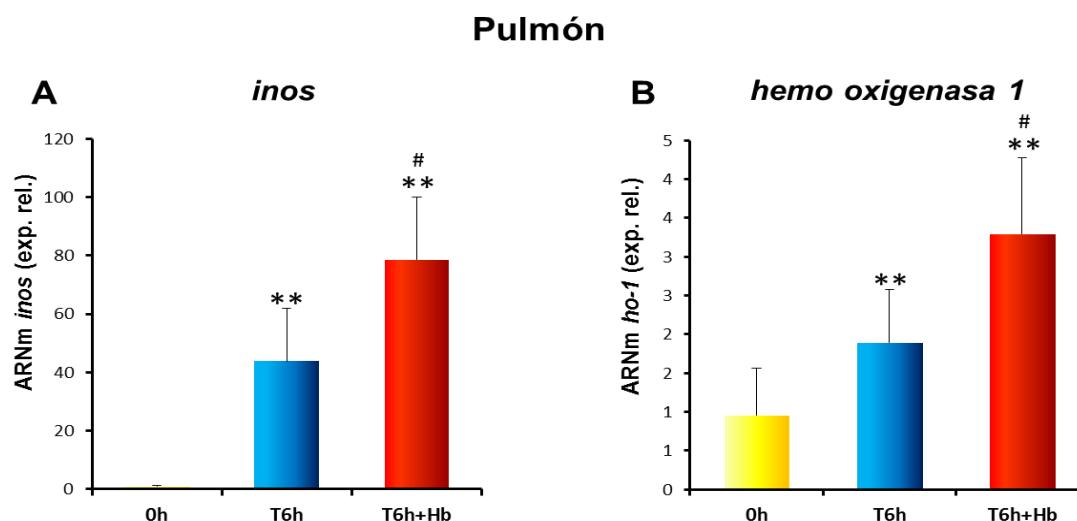


Figura 31.- Expresión de ARNm de *inos* y de *ho-1* en pulmón en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Niveles relativos de ARNm de *inos* (A) y de *ho-1* (B) vs. *rplp0* en tejido pulmonar de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. # P < 0.05 vs. T6h.

Por último, y siguiendo con el orden establecido hasta el momento, se analizaron las citoquinas inflamatorias. Tal como muestra la figura 32, observamos como la pancreatitis aguda regula al alza las 4 citoquinas estudiadas, produciendo un aumento en sus niveles transcripcionales. La inyección intraperitoneal de hemoglobina libre, en este caso, no produjo ningún cambio respecto al grupo de ratas *Wistar* con pancreatitis sacrificadas a las 6 horas.

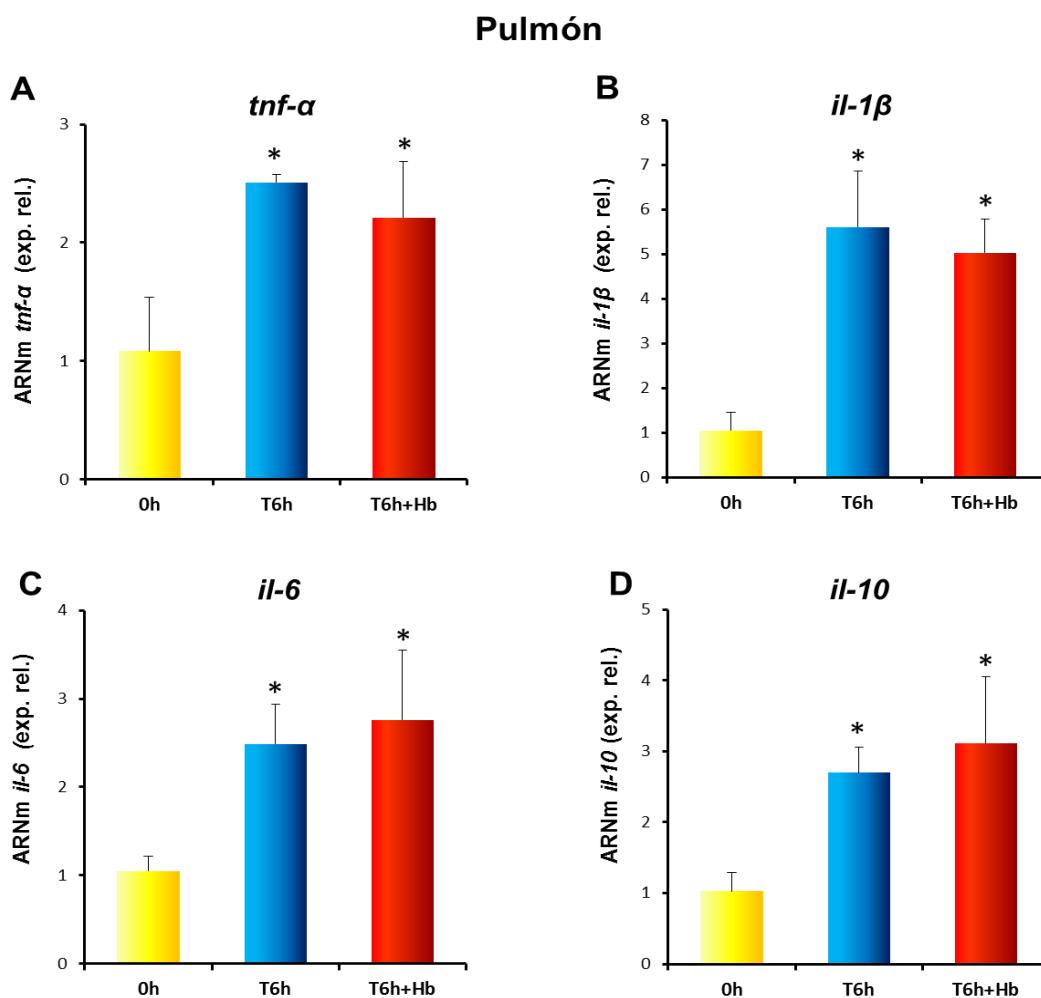


Figura 32.- Expresión de ARNm de *tnf-α*, *il-1β*, *il-6* e *il-10* en pulmón en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Niveles relativos de ARNm de *tnf-α* (A), *il-1β* (B), *il-6* (C) e *il-10* (D) vs. *rplp0* en tejido pulmonar de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: * P < 0.05 vs. tiempo "0" o control.

1.14. Infiltración leucocitaria en pulmón de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina.

Con el objeto de evaluar de forma más completa la respuesta inflamatoria pulmonar asociada a la pancreatitis aguda necrotizante, se determinó el nivel de infiltración leucocitaria a través de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO). En la figura 33 observamos que esta actividad enzimática es significativamente mayor en el pulmón de las ratas que han sufrido pancreatitis aguda inducida por taurocolato respecto al grupo de 0 horas. La inyección de la hemoglobina extracelular en la cavidad peritoneal aumentó de forma significativa los valores de actividad peroxidasa frente al grupo de 6 horas, estableciendo por tanto una relación entre hemoglobina e infiltración leucocitaria.

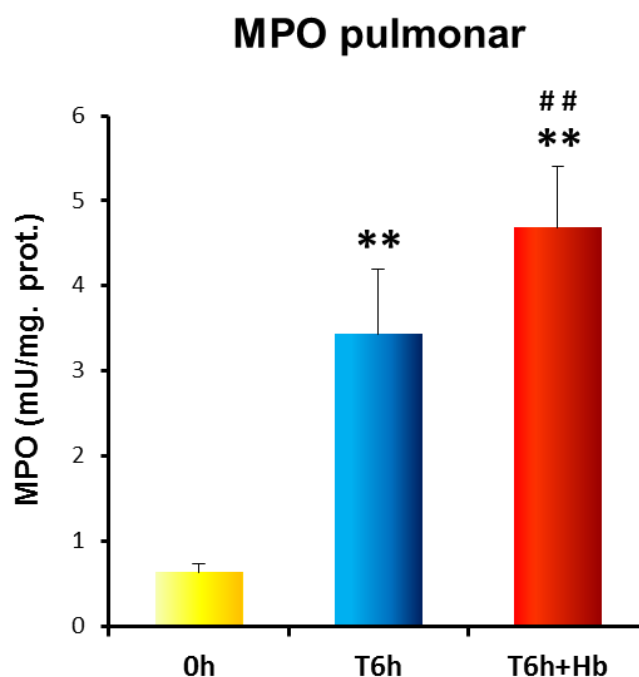


Figura 33.- Actividad mieloperoxidasa (MPO) en pulmón en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. La actividad MPO se expresó en mU/mg proteína y se midió en pulmón de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. ##P < 0.01 vs. T6h.

1.15. Regulación de la expresión de genes diana del Factor Inducible por Hipoxia (HIF-1 α) a nivel hepático y pulmonar en la pancreatitis aguda tras administración de hemoglobina extracelular.

En base a los resultados obtenidos en la expresión génica de *inos* en los distintos tejidos estudiados, nos planteamos analizar el posible papel que podía jugar la hemoglobina en la regulación del factor de transcripción HIF-1 α a nivel pulmonar, teniendo en cuenta que la *inos* es diana transcripcional de este factor. Para la caracterización de la vía de HIF-1 α , se escogieron tres dianas más de HIF-1 α , el factor de crecimiento A del endotelio vascular (*vegfa*), la óxido nítrico sintasa endotelial (*enos*) y la *hexoquinasa-2*, enzima relacionada con el metabolismo glucolítico preferente en condiciones anaeróbicas. La expresión génica de estas dianas se estudió tanto a nivel pulmonar como hepático.

Mediante qRT-PCR se observó que los niveles de ARNm de *vegfa* variaban de igual forma que los de la enzima inducible de la óxido nítrico sintasa (*inos*) en el hígado de las ratas *Wistar* con pancreatitis aguda. Aumentaban de manera significativa a las seis horas de la inducción con taurocolato, y no se modificaban tras la inyección de hemoglobina libre (Fig. 34A). En cambio, las otras dos dianas analizadas, *enos* y *hexoquinasa-2*, no vieron modificados sus niveles de expresión en hígado respecto a las condiciones basales en ninguno de los grupos experimentales (Fig. 34B y C).

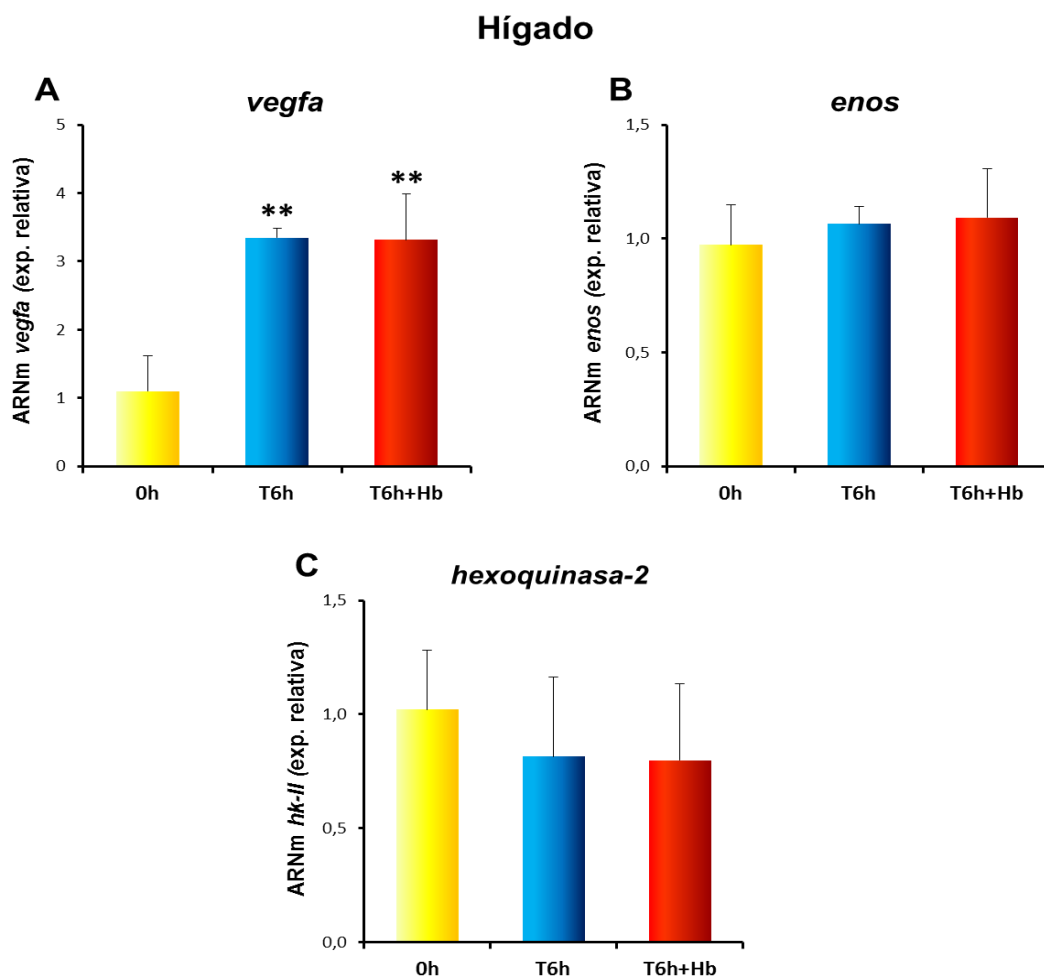


Figura 34.- Expresión de ARNm de *vegfa*, *enos* y *hexoquinasa-2* en hígado en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Niveles relativos de ARNm de *vegfa* (A), *enos* (B) y *hexoquinasa-2* (C) vs. *rplp0* en tejido hepático de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control.

Para confirmar el resultado obtenido en la expresión transcripcional de *vegfa*, se analizó la expresión proteica mediante *Western blot* de este factor de crecimiento. La figura 35 muestra un aumento en los niveles proteicos de VEGFA tras la inducción de la pancreatitis aguda y mantenimiento de estos niveles tras la inyección de hemoglobina libre en la cavidad peritoneal. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la regulación transcripcional del gen (Fig. 34A).

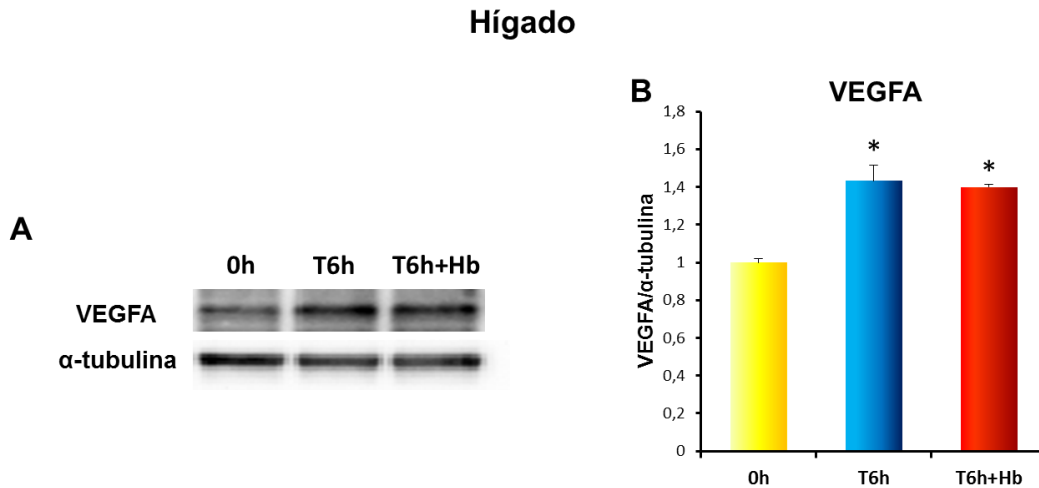


Figura 35.- Expresión proteica de VEGFA en hígado en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. *Western blot* representativo de VEGFA y α -tubulina (A) y densitometría frente a α -tubulina (B) en hígado de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: * P < 0.05 vs. tiempo “0” o control.

Una vez descartada la participación de HIF-1 α en la posible regulación que podía ejercer la hemoglobina extracelular asociada a la ascitis a nivel hepático, nos centramos en el territorio pulmonar, tejido en el que sí habíamos obtenido aumento en la expresión de una diana de HIF-1 α , la *inos* (Fig. 11A). Siguiendo los mismos pasos que en el hígado, se estudiaron las dianas mencionadas anteriormente, *vegfa*, *enos* y *hexoquinasa-2*. El perfil génico obtenido en las distintas condiciones experimentales fue idéntico al de la *inos* en pulmón. Tras la inducción de la pancreatitis aguda, hay un aumento significativo de la expresión de los diferentes genes, aumento que se hace más notable al aplicar la inyección intraperitoneal de hemoglobina libre (Fig. 36).

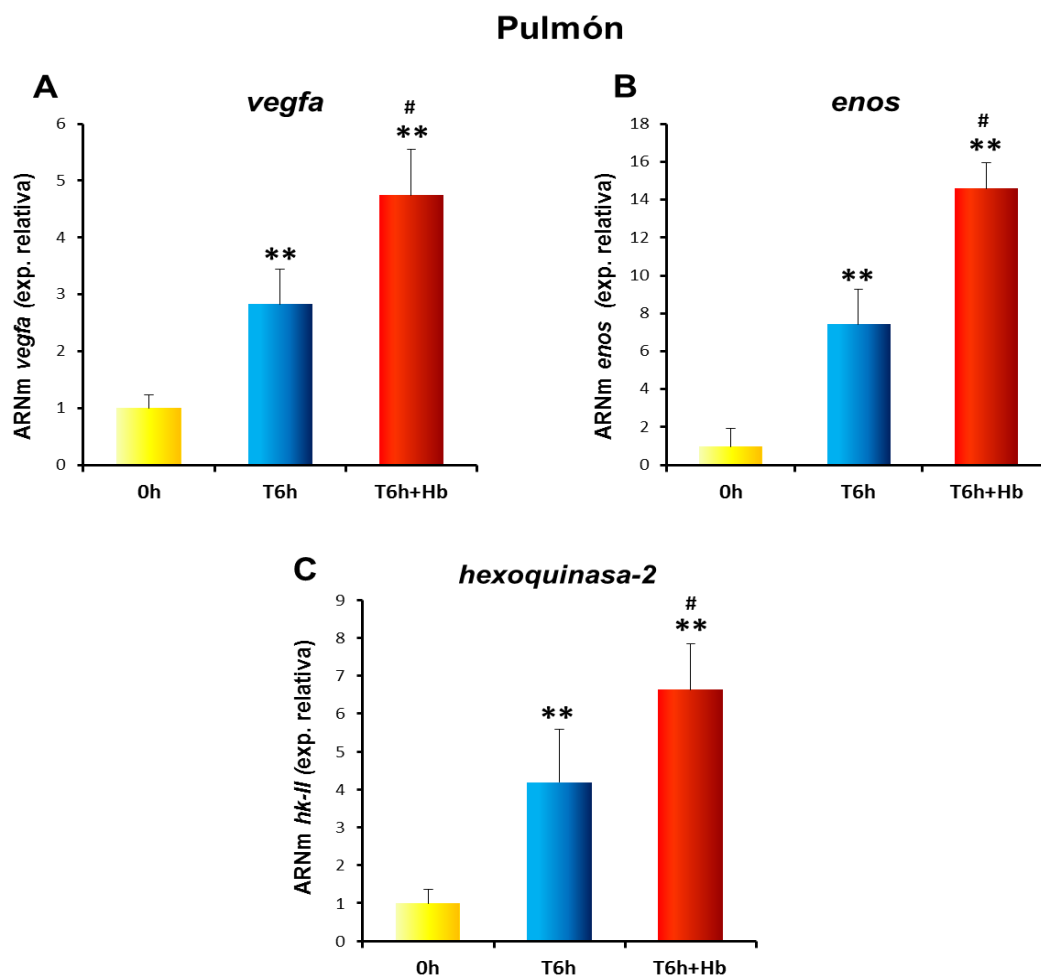


Figura 36.- Expresión de ARNm de *vegfa*, *enos* y *hexoquinasa-2* en pulmón en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. Niveles relativos de ARNm de *vegfa* (A), *enos* (B) y *hexoquinasa-2* (C) vs. *rplp0* en pulmón de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. # P < 0.05 vs. T6h.

Por último, y atendiendo a estos resultados, nos planteamos estudiar si el aumento en la transcripción de ARNm de *vegfa* se traduciría en un aumento en los niveles proteicos a nivel pulmonar. Tras la realización del *Western blot*, pudimos observar que el resultado hallado mediante el análisis génico se reflejaba en la expresión proteica. La inducción de la pancreatitis aguda eleva los niveles proteicos de VEGFA en el pulmón de las ratas *Wistar*. Tras la inyección de hemoglobina libre en el espacio peritoneal, VEGFA sigue aumentando su expresión proteica significativamente frente a las condiciones basales y respecto al grupo de pancreatitis de 6 horas (Fig. 37), hecho que constata la influencia que ejerce la hemoglobina asociada a la hemólisis de la ascitis sobre la regulación de genes dianas de HIF-1 α , a nivel transcripcional y proteico en el territorio pulmonar.

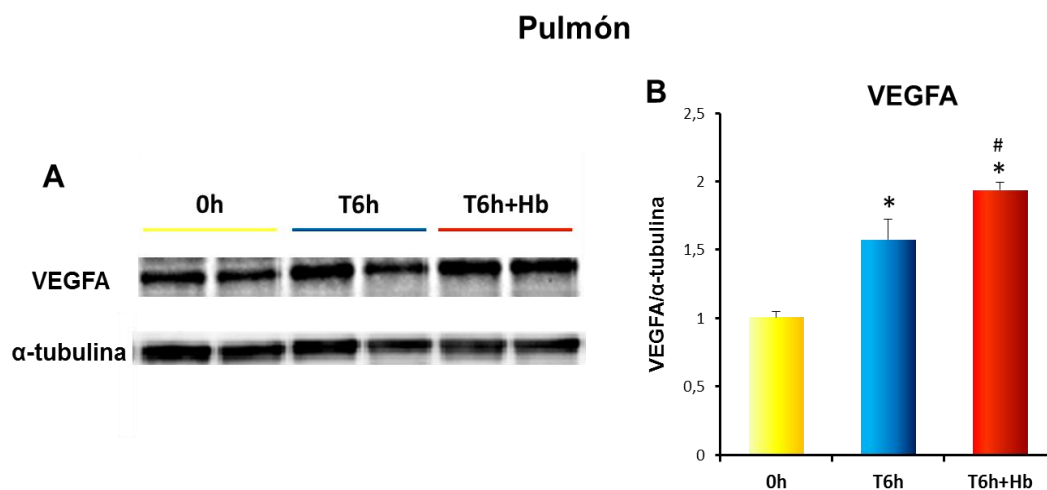


Figura 37.- Expresión proteica de VEGFA en pulmón en la pancreatitis aguda tras inyección intraperitoneal de hemoglobina. *Western blot* representativo de VEGFA y α -tubulina (A) y densitometría frente a α -tubulina (B) en pulmón de ratas *Wistar* a 0 horas (0h), a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda con taurocolato (T6h) y a las 6 horas de la inducción de pancreatitis aguda e inyección intraperitoneal de hemoglobina (T6h+Hb). La diferencia estadística se indica como sigue: * $P < 0.05$ vs. tiempo "0" o control. # $P < 0.05$ vs. T6h.

2. ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN RATAS OBESAS CON PANCREATITIS AGUDA.

2.1. Depleción y oxidación de glutatión en páncreas durante la pancreatitis aguda en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*).

El estudio del estrés oxidativo en la pancreatitis aguda se inició analizando los valores de glutatión reducido (GSH) en el tejido pancreático. Los niveles basales de GSH en páncreas de ratas obesas son más bajos que en páncreas de ratas control. Tras la inducción de pancreatitis, la depleción de glutatión ocurre en ambos grupos, pero a las 6 horas los niveles pancreáticos de GSH fueron significativamente más bajos en obesas que en ratas *lean* (Fig. 38A). Los niveles de glutatión oxidado (GSSG) no cambiaron significativamente durante la pancreatitis en ratas control (*lean*), pero aumentaron en obesas a las 6 horas de la inducción (Fig. 38B). Como consecuencia, el cociente GSSG/GSH fue mayor en ratas obesas que en ratas control. El cociente (GSSG/GSH)x1000 alcanzó un valor de 28 ± 9 en ratas obesas y de 13 ± 2 en ratas *lean* a las 6 horas después de la inducción de la pancreatitis.

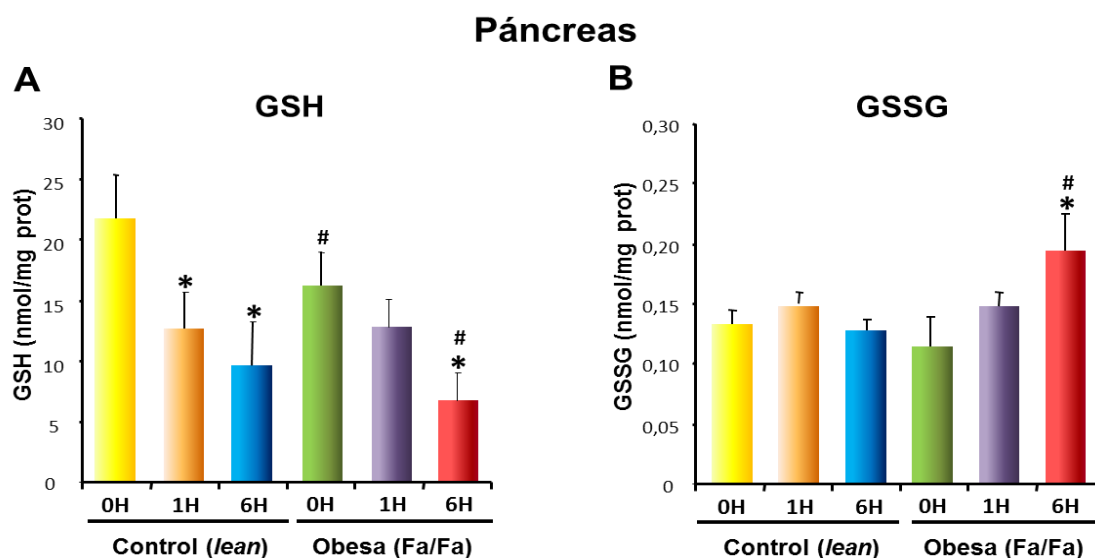


Figura 38.- Niveles pancreáticos de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) tras la inducción de pancreatitis aguda en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*). Concentración de GSH (A) y GSSG (B) en páncreas de ratas *lean* y obesas a 0, 1 y 6 horas después de inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: * P < 0.05 vs. tiempo "0" o control. # P < 0.05 obesas vs. *lean* en las mismas condiciones.

2.2. Estudio de la vía de la transulfuración durante la pancreatitis en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*).

Una vez observados los cambios producidos en los niveles pancreáticos de GSH tras la inducción de la pancreatitis aguda, nos planteamos estudiar cuatro componentes clave en la vía de la transulfuración, vía precursora de la síntesis de GSH.

Los niveles de metionina, S-adenosil metionina (SAM), cisteína y cistina fueron determinados en páncreas durante la pancreatitis en ratas control (*lean*) y obesas. Los niveles de metionina y sobre todo los de S-adenosil metionina se encontraron elevados en las ratas obesas respecto a las ratas control en condiciones basales, mientras que los niveles de cisteína y cistina no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos (Fig. 39). Es importante resaltar que los niveles de SAM fueron aproximadamente 4 veces más altos en el páncreas procedente de las ratas obesas que en el de las ratas *lean*. Tras la inducción de la pancreatitis hubo un marcado descenso en los niveles de SAM, especialmente en las ratas obesas (Fig. 39B). Los niveles de metionina sólo disminuyeron durante la pancreatitis en ratas obesas (Fig. 39A). Aunque los niveles de cisteína no cambiaron significativamente durante la pancreatitis, hubo un aumento destacable en su forma oxidada, cistina, a 1 y 6 horas tras inducción de la pancreatitis en ambos grupos (Fig. 39C y D).

Páncreas

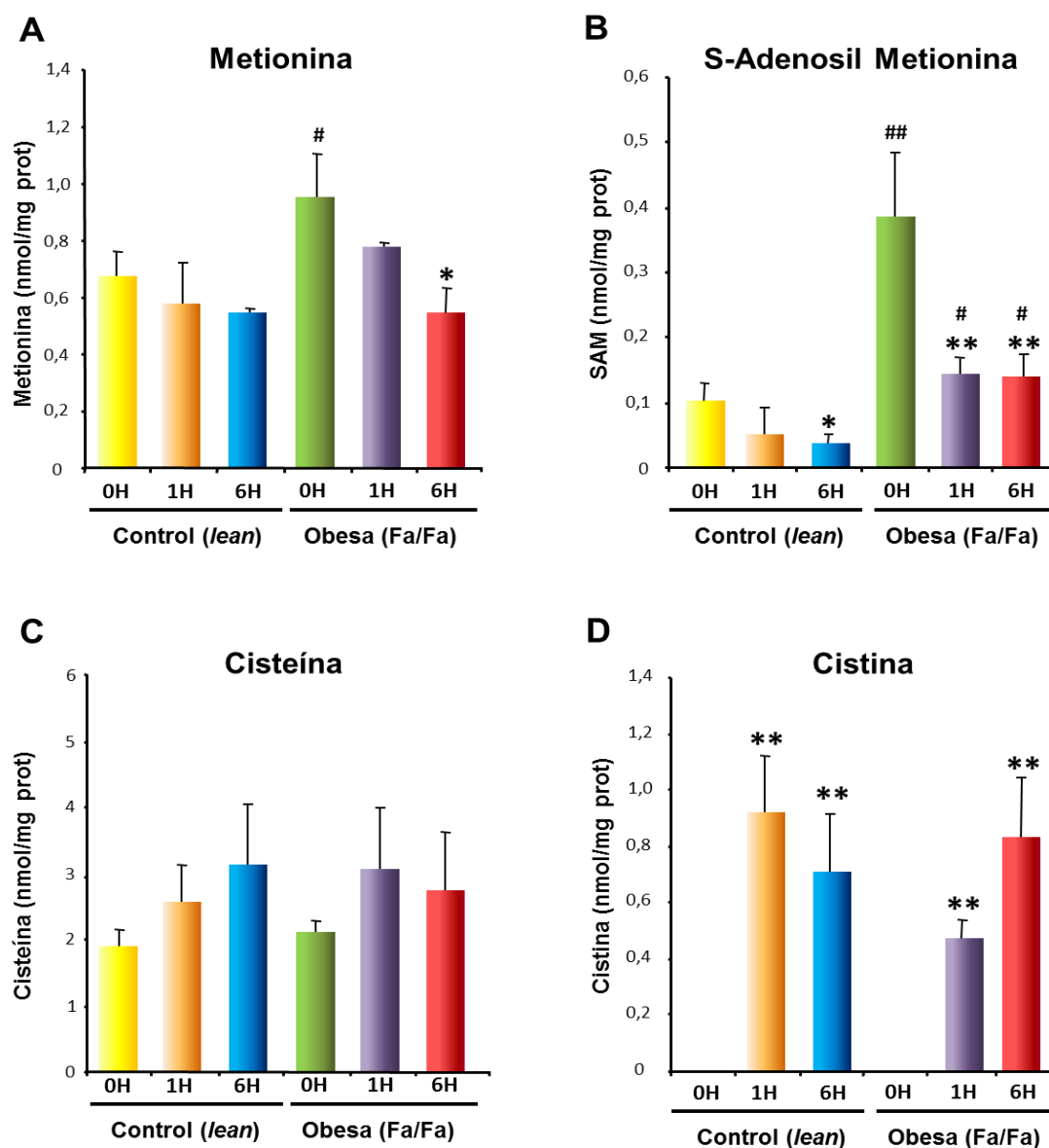


Figura 39.- Caracterización de la vía de la transulfuración en el páncreas de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) en la pancreatitis aguda. Niveles de metionina (A), S-adenosil metionina (B), cisteína (C) y cistina (D) en ratas *lean* y obesas (*Zucker*) a 0, 1 y 6 horas después de la inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: * $P < 0.05$ vs. tiempo "0" o control. ** $P < 0.01$ vs. tiempo "0" o control. # $P < 0.05$ y ## $P < 0.01$ obesas vs. *lean* en las mismas condiciones.

2.3. Pérdida de la actividad fosfatasa durante la pancreatitis en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*).

Con el fin de estudiar enzimas sensibles al estado redox y claves en la cascada inflamatoria en el páncreas durante la pancreatitis aguda, nos propusimos valorar las actividades de las enzimas proteín fosfatasas en la evolución de la patología en el tejido pancreático, tanto en ratas control como en ratas obesas.

En primer lugar, nos centramos en las serín/treonín fosfatasas PP1 y PP2A. Las actividades de las serín/treonín fosfatasas PP1 y PP2A en páncreas disminuyen a las 6 horas tras inducción de pancreatitis con taurocolato en ambos grupos, especialmente en las obesas. El porcentaje de disminución fue de 25 % para PP1 y de 21 % para PP2A en ratas *lean*, en cambio en ratas obesas fue de 46 % para PP1 y 32 % para PP2A (Fig. 40A y B). Respecto a la actividad tirosín fosfatasa, no hay cambios en las ratas *lean* a las 6 horas de inducción. Sin embargo, en ratas *Zucker* hubo un descenso leve, pero no significativo, de la actividad fosfatasa del orden de un 17 % en la pancreatitis aguda (Fig. 40C).

Páncreas

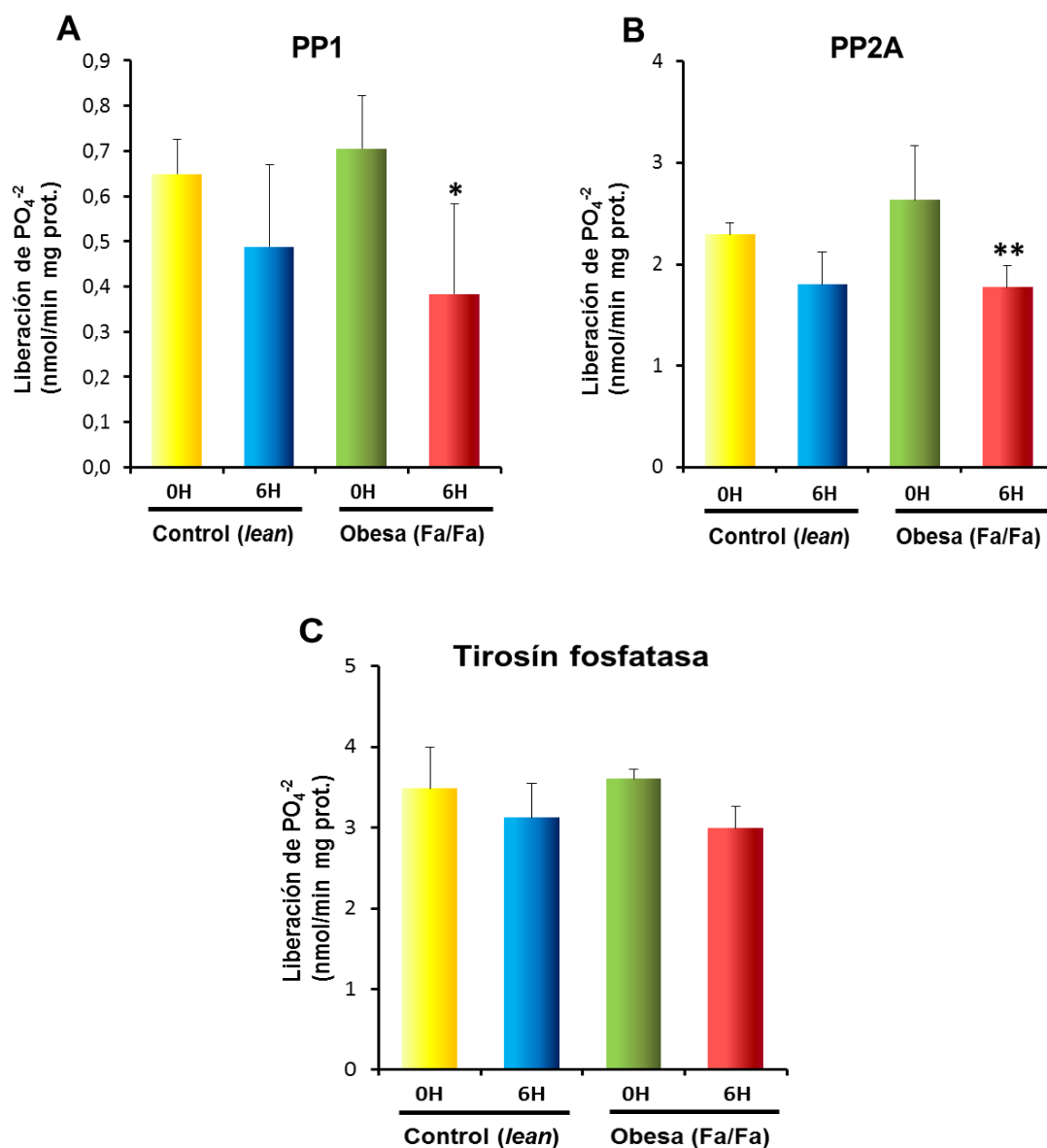


Figura 40.- Actividad fosfatasa en páncreas de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) después de inducción de la pancreatitis aguda. Las actividades serín/treonín fosfatasa – PP1(A) y PP2A (B) – y tirosín fosfatasa (C) se muestran como tasa de liberación de fosfatos por minuto en páncreas de ratas *lean* y obesas a 0 y 6 horas después de inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística es: * $P < 0.05$ vs. tiempo “0” o control. ** $P < 0.01$ vs. tiempo “0” o control.

2.4. Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH) en hígado y pulmón de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) en la pancreatitis aguda.

Tras el análisis del tejido pancreático, se determinaron los niveles de GSH en dos tejidos extrapancreáticos, hígado y pulmón, para observar el alcance sistémico que puede alcanzar la pancreatitis aguda en animales obesos.

Los niveles de GSH en hígado experimentaron una depleción significativa tras la inducción de pancreatitis en ambos grupos experimentales (Fig. 41A). Respecto al pulmón, los valores de GSH tienden a disminuir, pero sin diferencias significativas, en ratas *lean* después de la pancreatitis. En ratas obesas, los niveles pulmonares de GSH apenas sufren modificación durante el transcurso de la pancreatitis (Fig. 41B).

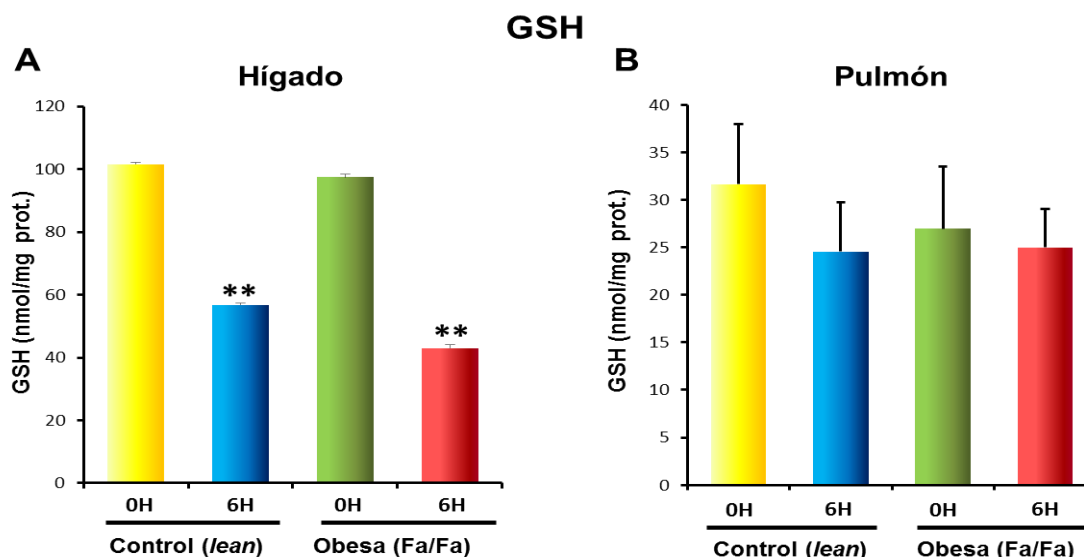


Figura 41.- Niveles de glutatión reducido (GSH) en hígado y pulmón tras la inducción de pancreatitis aguda en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*). Concentración de GSH en hígado (A) y pulmón (B) en ratas *lean* y obesas a 0 y 6 horas después de inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control.

2.5. Necrosis grasa y actividad lipasa en grasa abdominal en pancreatitis en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*).

A continuación, el estudio se centró en el tejido que diferencia principalmente a las ratas control (*lean*) y obesas, el tejido adiposo abdominal.

La cantidad de necrosis presente en la grasa abdominal durante la pancreatitis fue baja en ratas *lean*, pero muy alta en ratas obesas, cerca de diez veces más (Fig. 42A). También hay que destacar que la actividad lipasa es muy baja en la grasa abdominal en ambos grupos bajo condiciones basales, pero tras la inducción de la pancreatitis, la actividad lipasa en el tejido graso aumenta marcadamente en los dos grupos y este incremento es incluso mayor en las áreas de necrosis grasa (Fig. 42B). La alta presencia de lipasa en el tejido adiposo abdominal fue confirmada por *Western blot* (Fig. 42C), y este hecho ocurre especialmente en áreas de necrosis grasa de ratas obesas con pancreatitis.

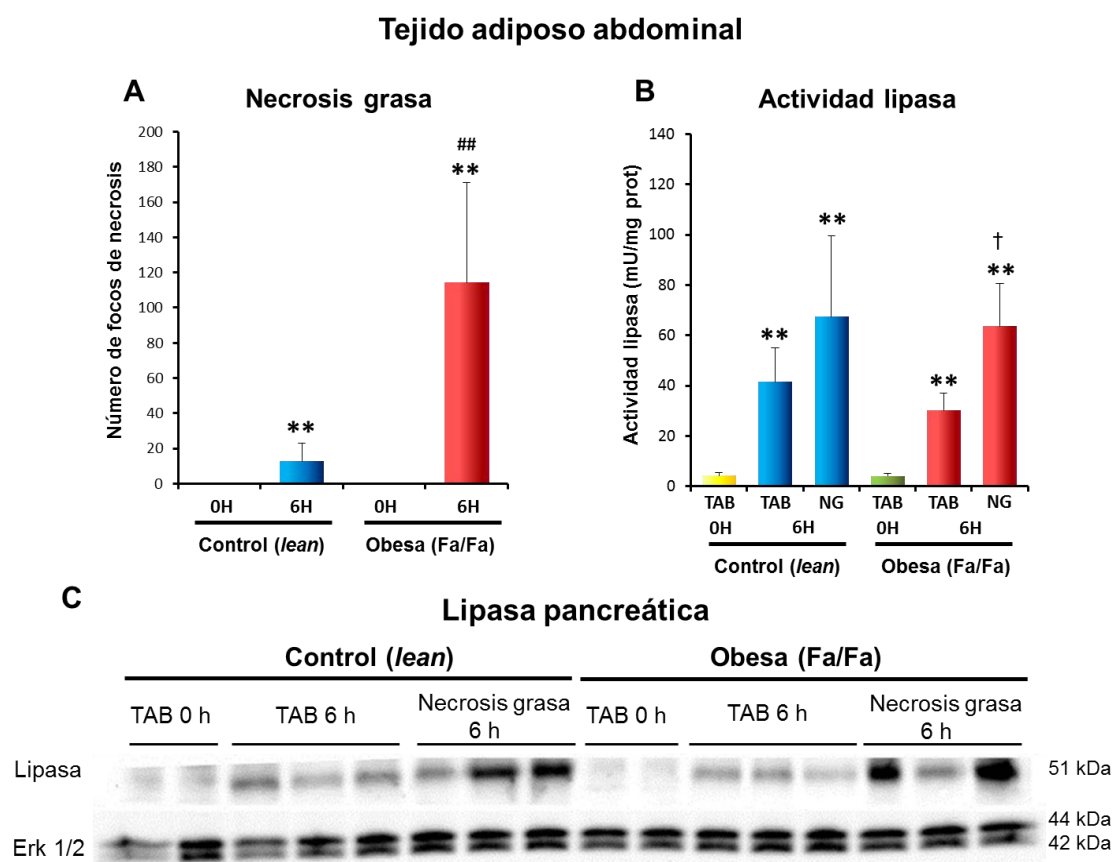


Figura 42.- Cuantificación macroscópica de necrosis grasa y presencia de lipasa pancreática en el tejido adiposo abdominal de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) tras la inducción de la pancreatitis aguda. Focos de necrosis grasa en ratas *lean* y obesas (*Zucker*) a 0 y 6 horas después de la inducción de pancreatitis aguda (A). La presencia de lipasa pancreática en el tejido adiposo abdominal en la pancreatitis aguda es ilustrada por el incremento de la actividad lipasa en tejido adiposo blanco abdominal (TAB) y en necrosis grasa (NG) (B) y por la imagen representativa del *Western blot* de lipasa pancreática en TAB y NG (C). Erk 1/2 fue usado como control de carga. La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. ## P < 0.01 obesas vs. *lean* en las mismas condiciones. †P < 0.05 NG vs TAB a 6 h en ratas obesas.

2.6. Niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres en plasma y en ascitis de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) con pancreatitis.

Tras observar la implicación que la lipasa pancreática y el tejido adiposo abdominal pueden tener en la evolución de la pancreatitis aguda en animales obesos, los experimentos se encaminaron a estudiar el papel que podría jugar el metabolismo lipídico en el transcurso de la patología.

La concentración de triglicéridos (TGL) en plasma fue dos veces mayor en ratas obesas que en ratas control (*lean*) en condiciones basales. Tras la inducción de la pancreatitis, los niveles de TGL disminuyeron en ambos grupos, especialmente en las ratas obesas (30 % de descenso en *lean* vs. 60 % de descenso en obesas) (Fig. 43A).

Los niveles de ácidos grasos libres (AGL) fueron tres veces más altos en el plasma de ratas obesas en condiciones basales (Fig. 43C). Después de la inducción de la pancreatitis, existe un descenso transitorio en los mismos. Concretamente, 1 hora después de inducir la pancreatitis descienden un 70 % en las control, frente a un 55 % en las *Zucker*. A las 6 horas, estos valores aumentan en las ratas *lean*, siendo la concentración 6 veces mayor que a 1 hora tras la inducción y 2 veces mayor que a las 0 horas. Respecto a las ratas obesas, los niveles a las 6 horas fueron 2 veces más que a 1 hora (Fig. 43C). En cualquier condición, los niveles de AGL fueron siempre más altos en las ratas obesas.

En el líquido ascítico, los niveles de TGL estaban aumentados en más del doble en las ratas obesas respecto a las *lean*, y los AGL fueron drásticamente más altos (4 veces) en este grupo (Fig. 43B y D). Destacar que los niveles de AGL fueron marcadamente altos en ambos grupos, 500 μM en ratas control (*lean*) y 2000 μM en ratas obesas (*Zucker*).

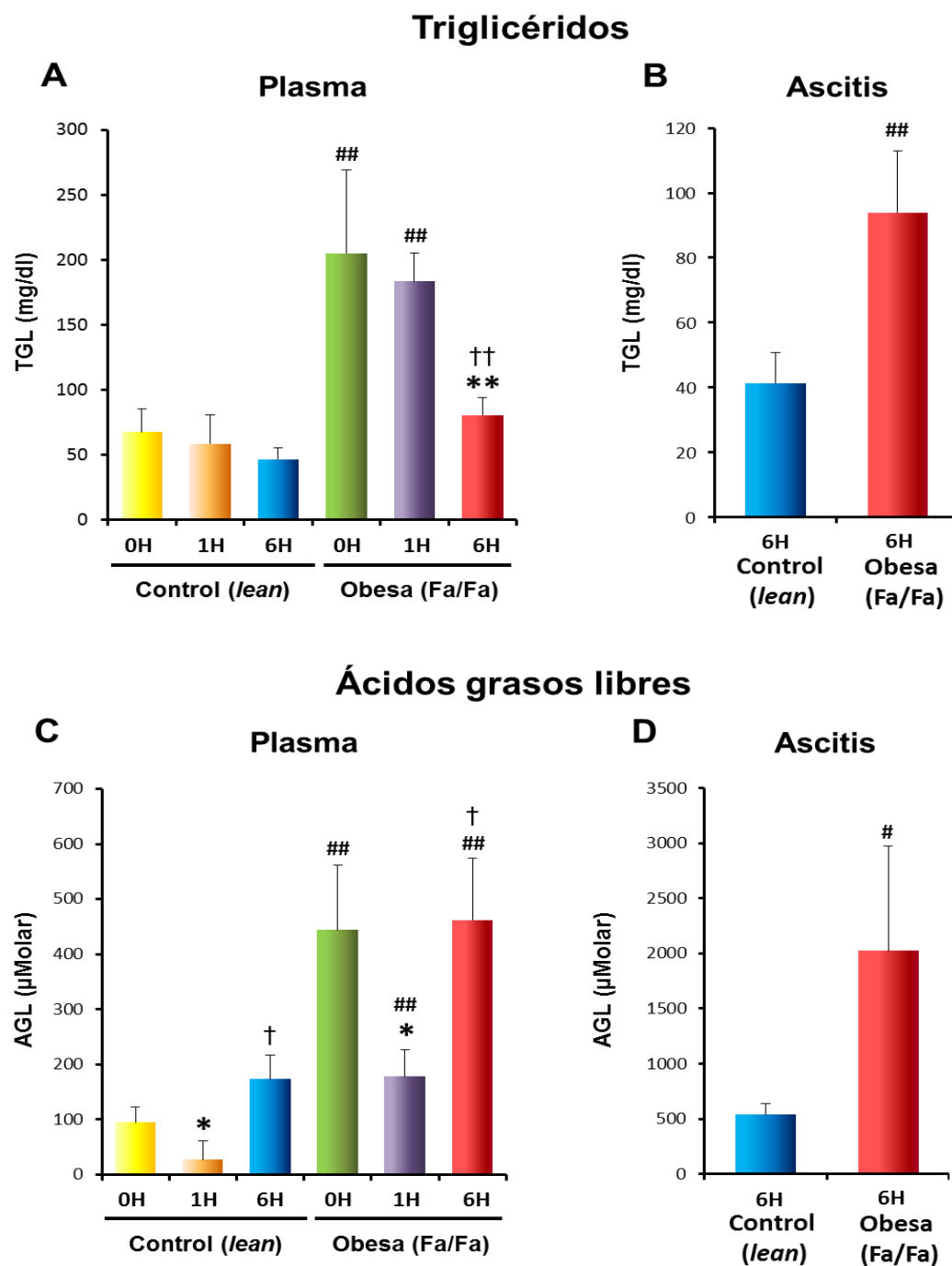


Figura 43.- Concentración de triglicéridos (TGL) y ácidos grasos libres (AGL) en plasma y en líquido ascítico en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) tras la inducción de la pancreatitis aguda. Los niveles de TGL y AGL fueron determinados en plasma (A, C) a 0, 1 y 6 horas post-inducción de pancreatitis aguda y en ascitis (B, D). La diferencia estadística se indica como sigue: * $P < 0.05$ vs. tiempo "0" o control. ** $P < 0.01$ vs. tiempo "0" o control. # $P < 0.05$ obesas vs. *lean* en las mismas condiciones. ## $P < 0.01$ obesas vs. *lean* en las mismas condiciones. † $P < 0.05$ obesas 6h vs. obesas 1h. †† $P < 0.01$ obesas 6h vs. obesas 1h.

2.7. Niveles de malondialdehído e isoprostanos en pancreatitis en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*).

Por último, y observando las diferencias existentes entre las ratas control (*lean*) y obesas en el perfil lipídico, se determinaron los niveles de malondialdehído (MDA) y del 15-isoprostano F_{2t} como marcadores de peroxidación lipídica *in vivo*.

Los niveles de MDA en plasma fueron más altos en ratas obesas que en ratas *lean* en condiciones basales. A las 6 horas de la inducción de la pancreatitis, los niveles plasmáticos de MDA no sufrieron cambios significativos en las ratas *lean*, mientras que disminuían significativamente a las 6 horas en el grupo de las ratas obesas (Fig. 44A).

En cuanto a los valores del 15-isoprostano F_{2t} en plasma, se observó una tendencia no significativa a estar aumentados en condiciones basales en las ratas obesas. Durante la pancreatitis, los niveles de isoprostanos aumentaron sólo de forma significativa en el grupo de las ratas obesas (Fig. 44C).

En ascitis, las concentraciones de MDA y del 15-isoprostano F_{2t} fueron más elevadas en las ratas obesas que en las *lean* (Fig. 44B y D). Además, la cantidad total de ambas moléculas en ascitis, teniendo en cuenta el volumen total de líquido ascítico recogido, fue mucho mayor en las ratas obesas (4.6 ± 2.7 nmoles de MDA y 9.6 ± 3.6 ng de isoprostanos en ratas obesas vs. 1.5 ± 0.9 nmoles de MDA y 1.09 ± 0.7 ng de isoprostanos en la ascitis de las ratas *lean*).

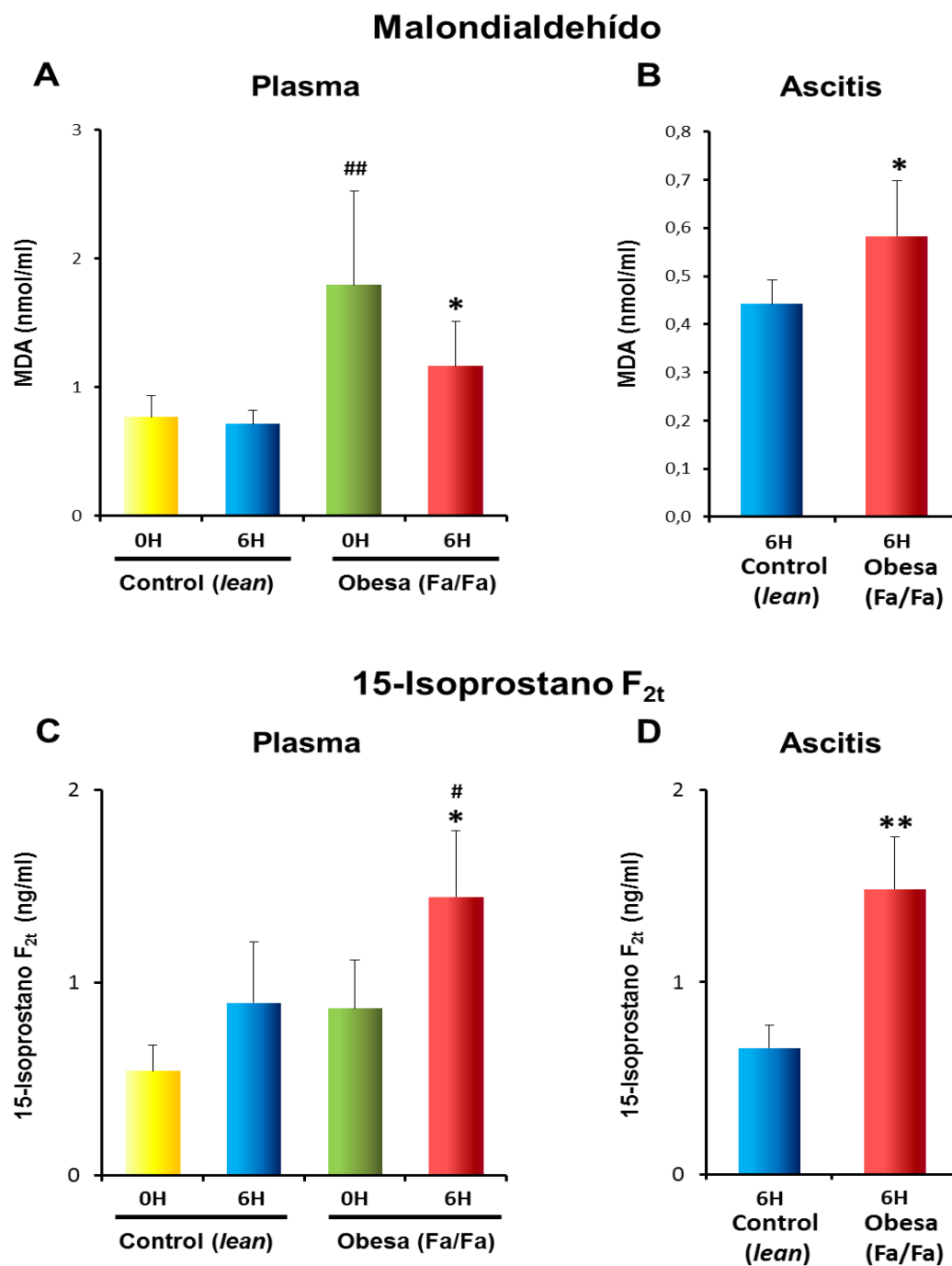


Figura 44.- Niveles de malondialdehído (MDA) y 15-Isoprostano F_{2t} en plasma y líquido ascítico en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) tras la inducción de la pancreatitis aguda. Los niveles de MDA y 15-Isoprostano F_{2t} fueron determinados en plasma (A, C) a 0 y 6 horas post-inducción de pancreatitis aguda y en ascitis (B, D). La diferencia estadística se indica como sigue: * P < 0.05 vs. tiempo "0" o control. ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. # P < 0.05 y ## P < 0.01 obesas vs. *lean* en las mismas condiciones.

3. EFECTO DEL LAVADO PERITONEAL EN LA EVOLUCIÓN DE LA PANCREATITIS AGUDA EN RATAS CONTROL (*LEAN*) Y OBESAS (*ZUCKER*).

3.1. Efecto del lavado peritoneal sobre la formación de necrosis grasa tras la inducción de pancreatitis en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*).

El número de focos de necrosis grasa en el tejido adiposo abdominal disminuye marcadamente, tanto en el grupo de las ratas control (*lean*) como en el de las ratas obesas, tras la aplicación del lavado peritoneal. Destaca en el grupo de ratas *lean* la desaparición por completo de los focos de necrosis grasa. En el grupo de las ratas obesas, aunque la desaparición no es total, su descenso es muy marcado, del orden de un 95 %, siempre teniendo en cuenta que partimos de diez veces más de áreas de necrosis grasa en las ratas obesas que en las ratas control tras la pancreatitis (Fig. 45).

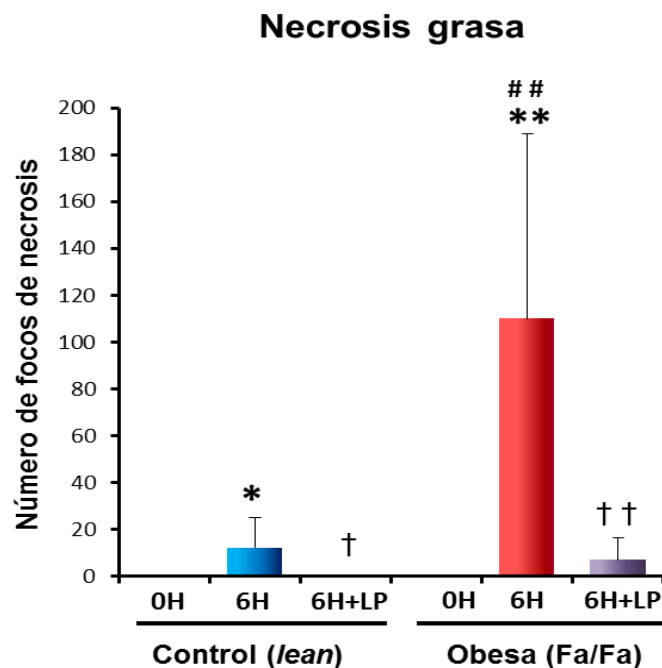


Figura 45.- Cuantificación macroscópica de necrosis grasa en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) con pancreatitis aguda y lavado peritoneal. El número de focos de necrosis grasa se cuantificó a 0 horas, 6 horas y 6 horas con lavado peritoneal después de la inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: * $P < 0.05$ vs. tiempo "0" o control. ** $P < 0.01$ vs. tiempo "0" o control. ## $P < 0.01$ obesas vs. *lean* en las mismas condiciones. † $P < 0.05$ lavado peritoneal vs. 6 horas. †† $P < 0.01$ lavado peritoneal vs. 6 horas.

3.2. Actividad lipasa pancreática en plasma de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) con pancreatitis y lavado peritoneal.

La actividad de la lipasa pancreática en plasma aumenta considerablemente en ambos grupos a las 6 horas de la inducción de la pancreatitis aguda, sin haber diferencias significativas entre ellos, tanto a nivel basal como a las mencionadas 6 horas de inducción. Al aplicar el lavado peritoneal, cabe destacar el descenso del orden de un 60 % tanto en el grupo de ratas *lean* como en el de ratas obesas, no observando diferencias significativas entre ambos grupos de nuevo (Fig. 46).

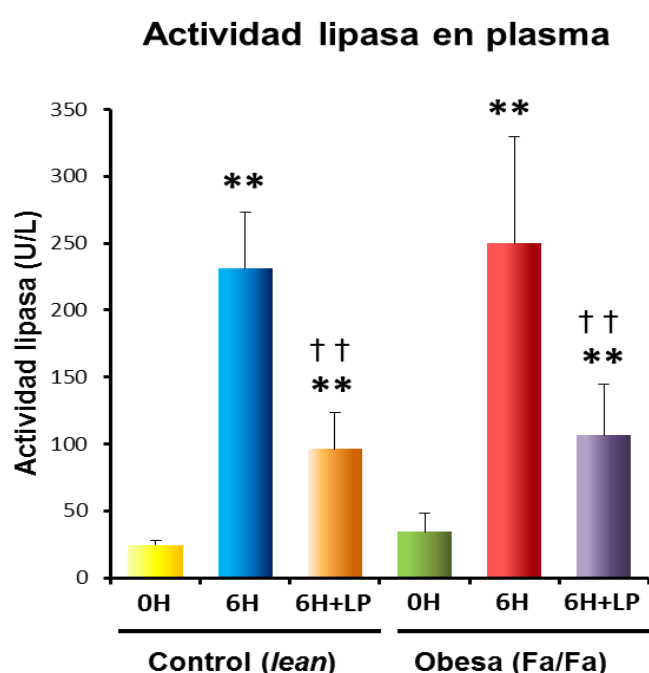


Figura 46.- Actividad lipasa pancreática en plasma de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) con pancreatitis aguda y lavado peritoneal. La medida de la actividad lipasa plasmática se realizó a 0 horas, 6 horas y 6 horas con lavado peritoneal después de la inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. ††P < 0.01 lavado peritoneal vs. 6 horas.

3.3. Niveles de glutatión reducido en páncreas tras la inducción de pancreatitis y aplicación del lavado peritoneal en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*).

En el estudio del efecto del lavado peritoneal sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) en tejido pancreático se confirmaron los resultados indicados anteriormente. Los valores de GSH en páncreas de ratas obesas son

más bajos que en páncreas de ratas control (*lean*) en condiciones basales (Figs. 38A y 47). Tras la inducción de la pancreatitis, el descenso en los niveles de glutatión es significativo en ambos grupos, resaltando que los niveles pancreáticos de GSH fueron significativamente más bajos en ratas obesas que en ratas *lean* (Figs. 38A y 47). Al realizar el lavado peritoneal, la depleción de los valores de GSH fue del mismo orden que en los grupos de pancreatitis sin lavado, destacando que los niveles seguían siendo significativamente más bajos en las ratas obesas que en las *lean* (Fig. 47).

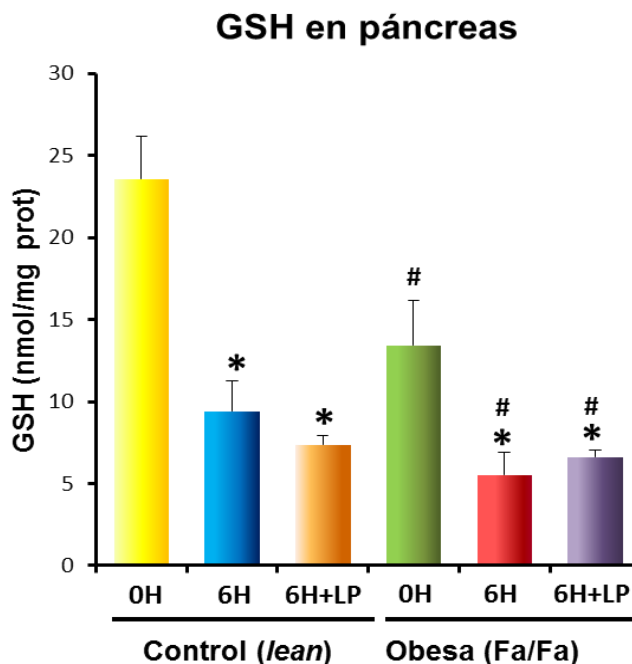


Figura 47.- Niveles de glutatión reducido (GSH) en páncreas de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) con pancreatitis aguda y lavado peritoneal. Los valores de GSH en tejido pancreático se midieron a 0 horas, 6 horas y 6 horas con lavado peritoneal después de la inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: * $P < 0.05$ vs. tiempo "0" o control. # $P < 0.05$ obesas vs. *lean* en las mismas condiciones.

3.4. Análisis de la expresión génica de *ho-1* y de *inos* en páncreas de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) con pancreatitis y lavado peritoneal.

En la figura 48A se observa que la expresión relativa de *ho-1* en el páncreas de las ratas obesas en condiciones basales es significativamente mayor que en las ratas control (*lean*). Tras la inducción experimental de la pancreatitis, la expresión génica de esta enzima en páncreas aumenta considerablemente (más de 20 veces) en ambos grupos, no habiendo diferencias entre los dos grupos analizados a las 6 horas de sufrir la patología. La realización del lavado peritoneal no modificó significativamente los valores

ARNm de *ho-1* en páncreas respecto al grupo de 6 horas, y por tanto, las diferencias sobre los grupos control se mantienen. En el análisis de la *inos*, no obtuvimos las diferencias a nivel basal encontradas con la *ho-1*. Una vez inducida la pancreatitis y practicado el lavado de la ascitis, el perfil de la expresión de *inos* sigue el mismo patrón que la *ho-1*, resaltando que las expresiones relativas de *inos* son marcadamente elevadas en la pancreatitis aguda, casi 200 veces más que en los grupos de 0 horas (Fig. 48B).

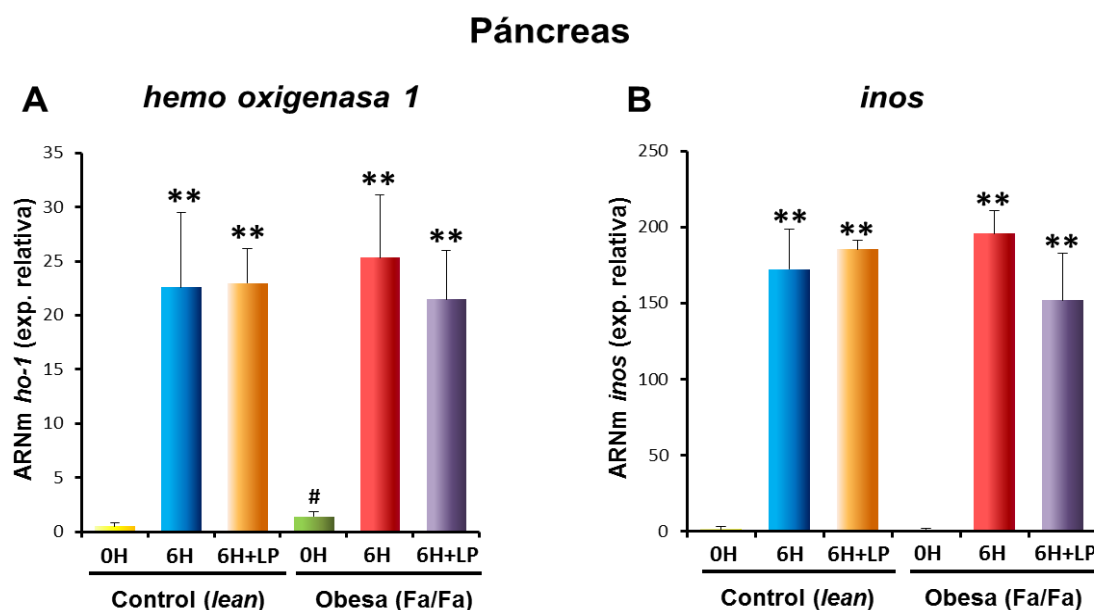


Figura 48.- Expresión de ARNm de *ho-1* y de *inos* en páncreas de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal. Niveles relativos de ARNm de *ho-1* (A) y de *inos* (B) vs. *rplp0* en páncreas de ratas *lean* y obesas a 0 horas, 6 horas y 6 horas con lavado peritoneal después de la inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. #P < 0.05 obesas vs. *lean* en las mismas condiciones.

3.5. Expresión génica de *ho-1* y de *inos* en hígado de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) con pancreatitis y lavado peritoneal.

En el análisis transcripcional de estas dos enzimas en el tejido hepático, los resultados obtenidos fueron diferentes a los observados en el páncreas. Respecto a la *ho-1*, los niveles de expresión génica en condiciones basales también fueron significativamente más elevados en las ratas obesas. Al inducir la pancreatitis, ambos grupos presentaron un aumento de la expresión génica a las 6 horas, siendo este aumento mayor en el grupo de las ratas obesas. Al aplicar el lavado peritoneal, las ratas *lean* presentan una tendencia no significativa a disminuir la expresión de *ho-1*. En cambio, en las ratas obesas sí

se observa un descenso significativo en los niveles de expresión génica de esta enzima asociada a inflamación, igualándose a los obtenidos en las ratas *lean* con pancreatitis y lavado peritoneal (Fig. 49A).

Respecto al estudio de la expresión génica de *inos* en el hígado, la figura 49B muestra que el perfil obtenido es el mismo que el de la *ho-1*. Existe diferencia significativa a 0 horas, con niveles mayores en las ratas obesas, incremento de la expresión con la pancreatitis, y sólo descenso de los niveles en el grupo de las ratas obesas cuando realizamos el lavado peritoneal. También destacar que los niveles transcripcionales de *inos* fueron mayores que los de *ho-1* (prácticamente el doble), pero no alcanzando valores tan elevados como se obtuvieron en el páncreas.

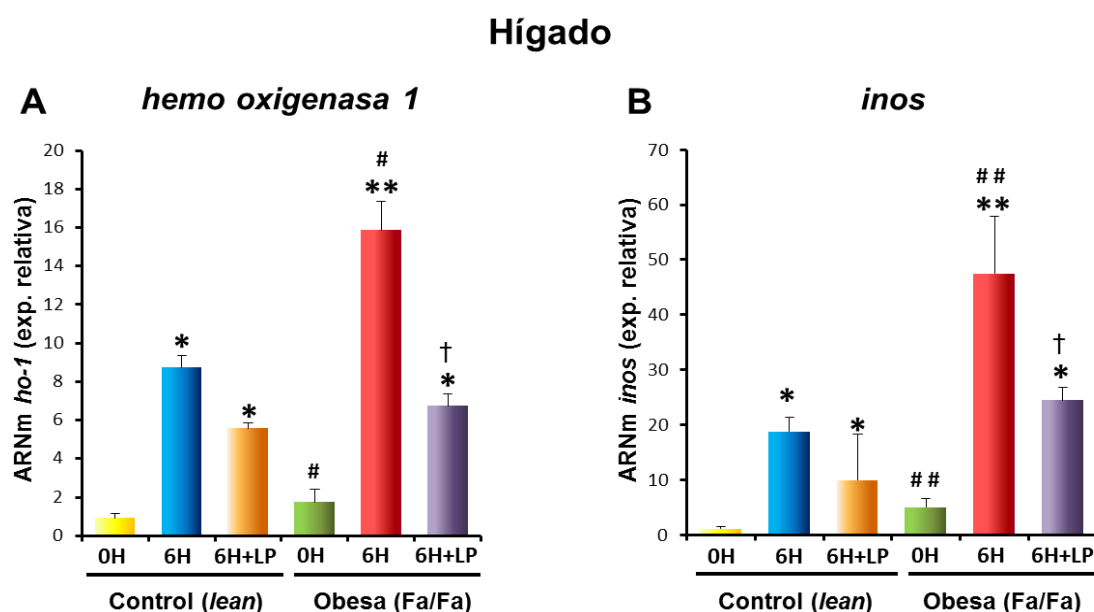


Figura 49.- Expresión de ARNm de *ho-1* y de *inos* en hígado de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal. Niveles relativos de ARNm de *ho-1* (A) y de *inos* (B) vs. *rplp0* en hígado de ratas *lean* y obesas a 0 horas, 6 horas y 6 horas con lavado peritoneal después de la inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: * $P < 0.05$ vs. tiempo "0" o control. ** $P < 0.01$ vs. tiempo "0" o control. # $P < 0.05$ obesas vs. *lean* en las mismas condiciones. ## $P < 0.01$ obesas vs. *lean* en las mismas condiciones. † $P < 0.05$ lavado peritoneal vs. 6 horas.

3.6. Papel del lavado peritoneal en la regulación transcripcional de genes relacionados con la inflamación en el tejido adiposo abdominal de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) con pancreatitis.

En base al análisis transcripcional de *ho-1* y de *inos* en páncreas e hígado, en primer lugar se estudió la expresión de estos genes en el tejido

adiposo abdominal tras la inducción de la pancreatitis, así como la repercusión que podría tener el drenaje del líquido ascítico sobre su expresión génica.

En la figura 50A se observa que la expresión relativa de *ho-1* está aumentada en condiciones basales en el tejido adiposo de las ratas obesas, como sucedía en el tejido pancreático y en el tejido hepático. A las 6 horas de la pancreatitis, las ratas *lean* y las ratas obesas inducen la expresión génica de *ho-1* en el tejido adiposo más de 8 veces, no existiendo diferencias de expresión entre ellas. Al retirar la ascitis de la cavidad peritoneal, los niveles de ARNm de *ho-1* en el tejido adiposo descienden significativamente en ambos grupos.

En relación a la expresión génica de *inos* en el tejido adiposo abdominal, destacamos de nuevo el paralelismo con la expresión de *ho-1*, como sucede en páncreas e hígado. El comportamiento de *inos* es prácticamente idéntico al de *ho-1*, resaltando sólo la ausencia de diferencia significativa en condiciones basales entre ambos grupos (Fig. 50B).

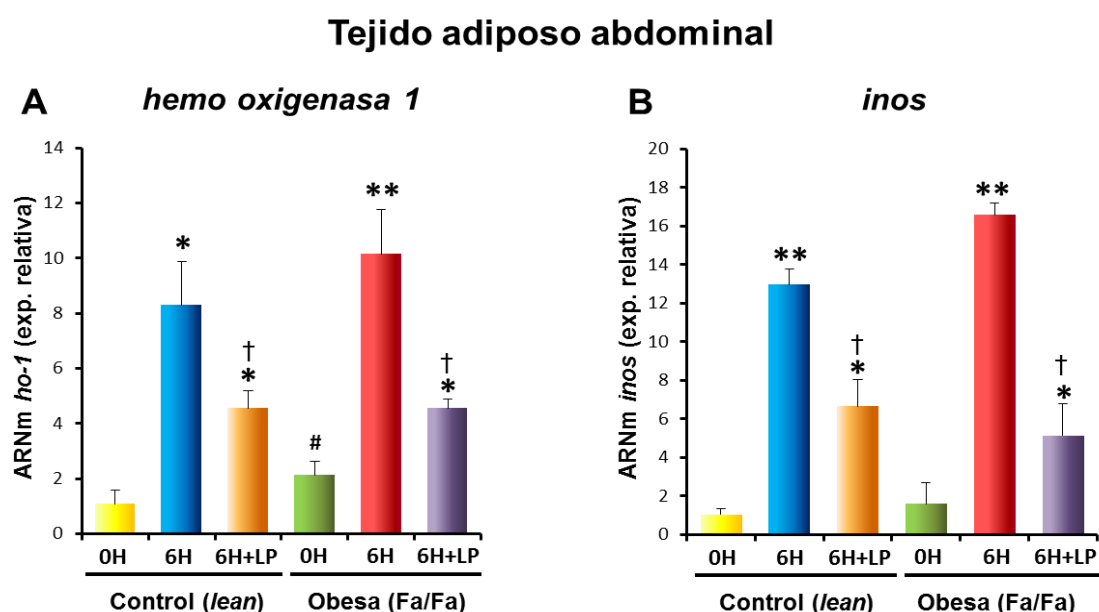


Figura 50.- Expresión de ARNm de *ho-1* y de *inos* en tejido adiposo abdominal de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal. Niveles relativos de ARNm de *ho-1* (A) y de *inos* (B) vs. *rplp0* en tejido adiposo abdominal de ratas *lean* y obesas a 0 horas, 6 horas y 6 horas con lavado peritoneal después de la inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: * $P < 0.05$ vs. tiempo "0" o control. ** $P < 0.01$ vs. tiempo "0" o control. # $P < 0.05$ obesas vs. *lean* en las mismas condiciones. † $P < 0.05$ lavado peritoneal vs. 6 horas.

Para completar el estudio transcripcional de los genes relacionados con la inflamación en el tejido adiposo, se examinaron las variaciones en la expresión génica de tres citoquinas pro-inflamatorias, *tnf- α* , *il-1 β* e *il-6*.

En primer lugar se analizó la expresión de *tnf- α* . Se observó que la expresión de esta citoquina es significativamente más elevada en condiciones basales en ratas obesas que en ratas *lean* en el tejido adiposo abdominal. Los valores de expresión génica aumentaron proporcionalmente 1,5 veces tras la pancreatitis, manteniéndose por tanto la diferencia significativa entre ambos grupos a las 6 horas de la inducción. En este punto destaca que la expresión génica de *tnf- α* en el tejido adiposo de ratas obesas control es igual a la expresión en ratas *lean* a las 6 horas con pancreatitis. Al aplicar el lavado, obtenemos una disminución significativa en ambos grupos experimentales, desapareciendo la diferencia existente en los valores relativos de ARNm que había entre ambos grupos (Fig. 51A).

Posteriormente, se analizó la evolución de la *il-1 β* en las distintas condiciones experimentales. De nuevo aparece la habitual diferencia significativa en condiciones basales, con niveles más de 3 veces superiores en ratas obesas que en ratas *lean*. Con el transcurso de la pancreatitis, estos niveles de expresión aumentan hasta alcanzar diferencias significativas respecto a los niveles basales en ambos grupos. El efecto del lavado peritoneal se tradujo en una disminución significativa de la expresión de *il-1 β* tanto en las ratas *lean* como en las obesas, siendo esta reducción mayor en el grupo de las ratas obesas (Fig. 51B).

Por último, siguiendo en el tejido adiposo abdominal, se estudió la expresión génica de la *il-6*, ya que su expresión responde al estímulo de *tnf- α* e *il-1 β* . Como ocurre con las otras dos citoquinas pro-inflamatorias, las ratas obesas de 0 horas sobreexpresan el gen respecto a las ratas *lean*, aproximadamente 10 veces. A las 6 horas del inicio de la patología, ambos grupos aumentan la transcripción de *il-6* de manera muy marcada, observando una elevación de los niveles del orden de 40 veces, siendo este aumento mucho mayor que en el caso de las otras dos citoquinas. Al realizar el drenaje de la ascitis tras la inducción de la pancreatitis, se observó disminución significativa de los niveles de expresión en ambos grupos, siendo estos valores significativamente mayores que los obtenidos en condiciones basales (Fig. 51C).

Tejido adiposo abdominal

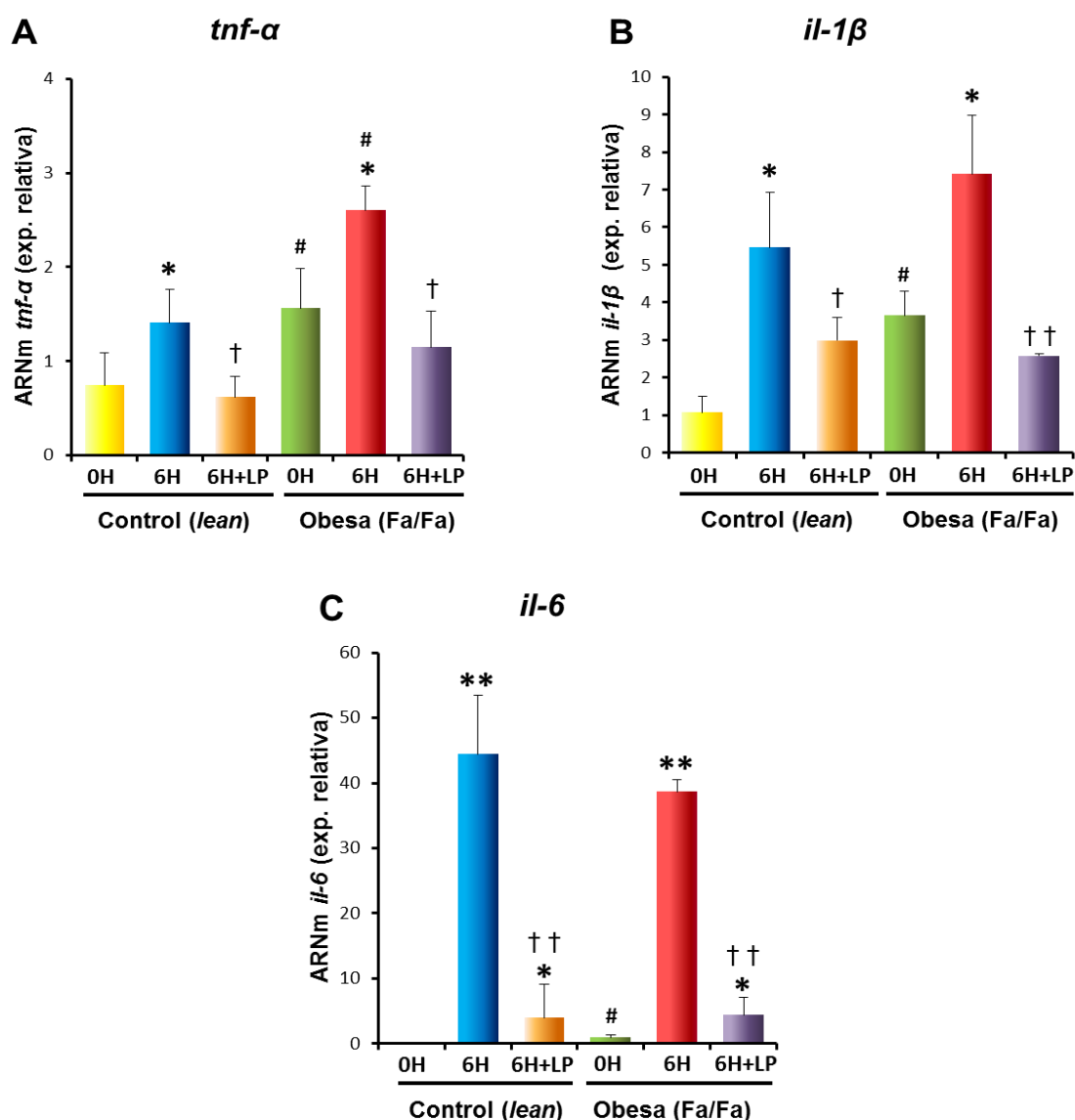


Figura 51.- Expresión de ARNm de *tnf-α*, *il-1β* e *il-6* en tejido adiposo abdominal en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*). Niveles relativos de ARNm de *tnf-α* (A), *il-1β* (B) e *il-6* (C) vs. rplp0 en tejido adiposo abdominal de ratas *lean* y obesas a 0 horas, 6 horas y 6 horas con lavado peritoneal después de la inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: * P < 0.05 vs. tiempo "0" o control. ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. #P < 0.05 obesas vs. *lean* en las mismas condiciones. ##P < 0.01 obesas vs. *lean* en las mismas condiciones. ††P < 0.01 lavado peritoneal vs. 6 horas.

3.7. Infiltración leucocitaria en pulmón de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) con pancreatitis aguda y lavado peritoneal.

En la figura 52 se puede observar, en primer lugar, que en condiciones basales se detectó el doble de actividad mieloperoxidasa (MPO) en los pulmones de las ratas obesas respecto a las ratas controles. Como consecuencia de la pancreatitis aguda, la actividad manifestó un incremento significativo en ambos grupos, manteniéndose mayor actividad en el pulmón de las obesas. En último lugar se analizó el posible efecto que podría ejercer la retirada del líquido ascítico asociado a la pancreatitis sobre la infiltración leucocitaria. Al estudiar estos grupos experimentales se detectó una disminución de la actividad MPO pulmonar sólo en las ratas obesas tras el lavado peritoneal, igualándose la actividad MPO a la obtenida en las ratas obesas en condiciones basales.

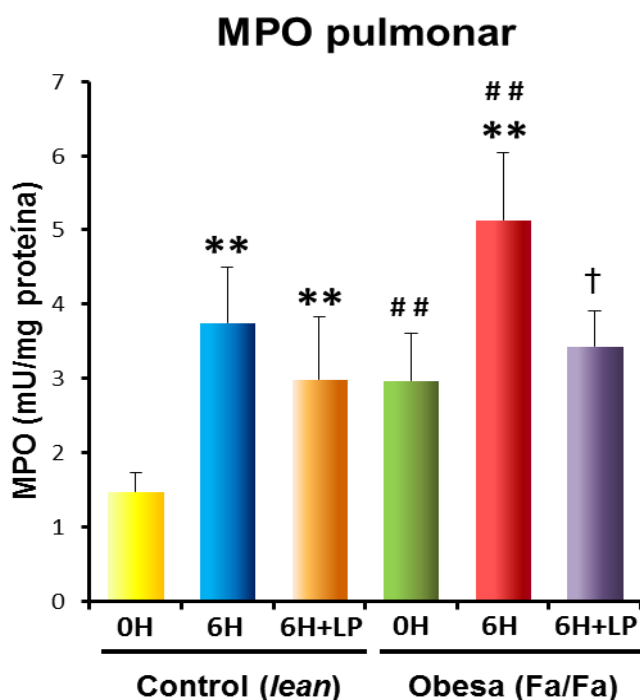


Figura 52.- Actividad mieloperoxidasa (MPO) en pulmón de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal. La MPO se expresó en mU/mg proteína y se midió en pulmón de ratas *lean* y obesas a 0 horas, 6 horas y 6 horas con lavado peritoneal después de la inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. ##P < 0.01 obesas vs. *lean* en las mismas condiciones. †P < 0.05 lavado peritoneal vs. 6 horas.

3.8. Estudio de la expresión de genes diana de HIF-1 α en pulmón de ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*) tras inducción de pancreatitis y realización de lavado peritoneal.

Con el fin de determinar si el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) está involucrado en la evolución de la pancreatitis a nivel pulmonar en las ratas obesas, se analizó la expresión de cuatro posibles dianas de este factor de transcripción.

Para tratar de dilucidar la participación de HIF-1 α en la fisiopatología del pulmón en la pancreatitis, nos propusimos estudiar en primer lugar la expresión génica de la enzima *inos*. En la figura 53A observamos, igual que en otros tejidos, la sobreexpresión de esta enzima en condiciones basales en las ratas obesas. Una vez inducida la pancreatitis, los niveles de expresión aumentan de manera muy marcada, alrededor de 30 veces, tanto en ratas *lean* como en ratas obesas, no observando diferencias entre ellas. Tras la aplicación del lavado peritoneal, disminuyeron de forma significativa los valores relativos de ARNm en ambos grupos respecto a los grupos de 6 horas, no obteniéndose diferencias significativas entre ellos.

La siguiente diana de HIF-1 α estudiada fue *vegfa*. Al contrario que sucedía con la *inos*, en condiciones basales no se observó diferencia de expresión de este factor de crecimiento entre los dos grupos. A las 6 horas de la pancreatitis, ambos grupos vieron incrementada su expresión de forma ligera pero significativa. El efecto del lavado del líquido ascítico originó descenso de los valores de expresión génica de *vegfa* en el grupo de las ratas *lean* y en el de las ratas obesas (Fig. 53B).

En la figura 53C se evaluó la regulación de otra enzima implicada en la síntesis de óxido nítrico y dependiente de la vía de HIF-1 α , la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa, *enos*. Aunque los valores de expresión alcanzados no son tan elevados como en la otra isoforma (*inos*), su patrón es bastante comparable. En ambos grupos experimentales, la pancreatitis aumenta alrededor de 3 veces la expresión génica de *enos*. Como sucedía con la expresión de *inos*, existe una disminución significativa de los niveles transcripcionales de *enos* tras la realización del drenaje peritoneal en ambos grupos.

Por último, y para finalizar con la caracterización de la vía de HIF-1 α a nivel pulmonar, se analizó la hexoquinasa-2. Los niveles de expresión de *hexoquinasa-2* variaron de forma paralela a las otras dianas de HIF-1 α . Se observó un incremento de expresión de alrededor de 3 veces tras la inducción

de la pancreatitis y un descenso de los niveles tras aplicar el lavado peritoneal, siendo la disminución significativa sólo en el grupo de las ratas obesas (Fig. 53D).

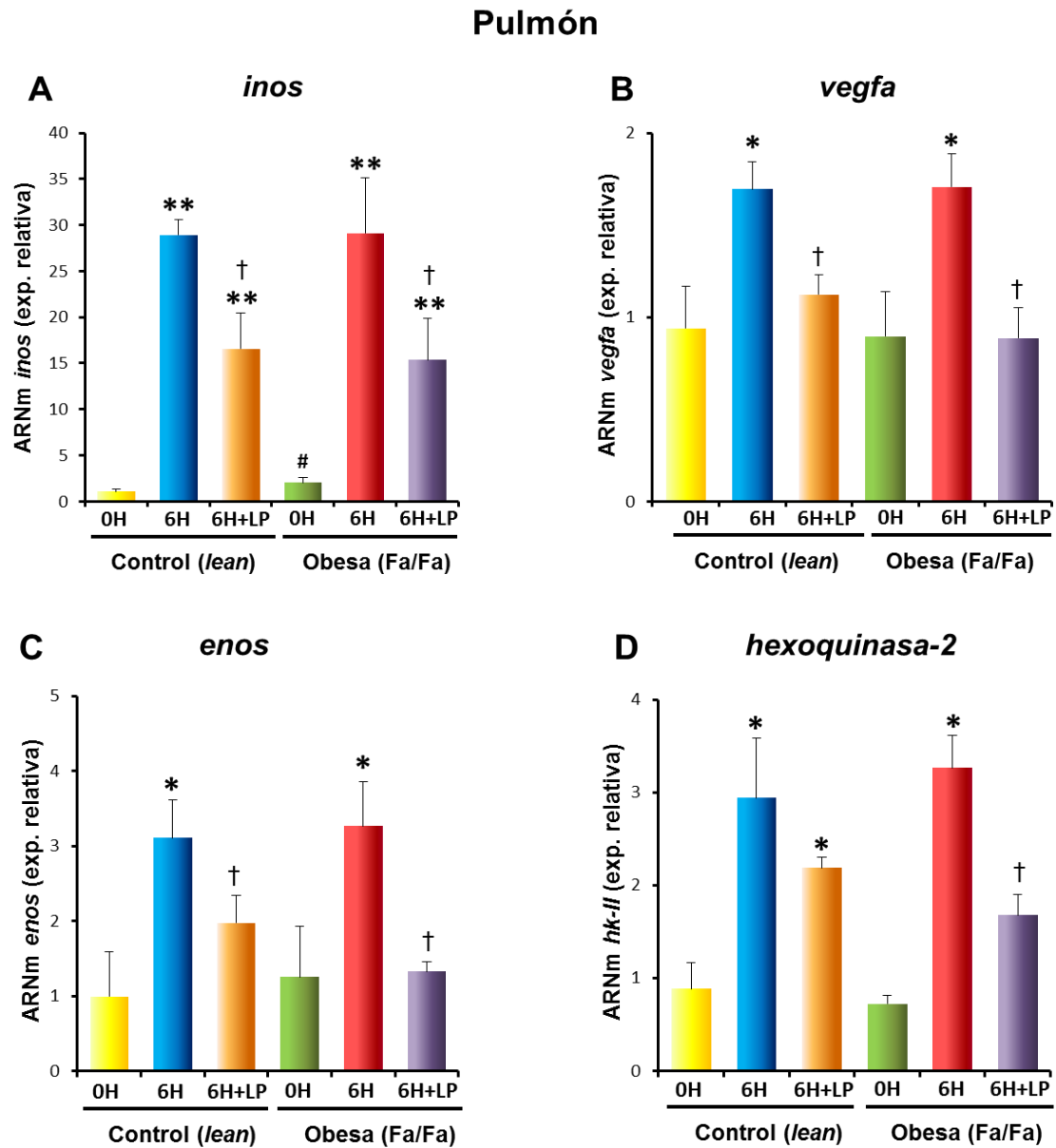


Figura 53.- Expresión de ARNm de *inos*, *vegfa*, *enos* y *hexoquinasa-2* en pulmón en la pancreatitis aguda con lavado peritoneal en ratas control (*lean*) y obesas (*Zucker*). Niveles de ARNm de *inos* (A), *vegfa* (B), *enos* (C) y *hexoquinasa-2* (D) vs. *rplp0* en pulmón de ratas *lean* y obesas a 0 horas, 6 horas y 6 horas con lavado peritoneal después de la inducción de pancreatitis aguda. La diferencia estadística se indica como sigue: * P < 0.05 vs. tiempo "0" o control. ** P < 0.01 vs. tiempo "0" o control. #P < 0.05 obesas vs. *lean* en las mismas condiciones. †P < 0.05 lavado peritoneal vs. 6 horas.

V-DISCUSIÓN

1. MODELO EXPERIMENTAL DE PANCREATITIS AGUDA.

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

En los primeros estudios de Aho y colaboradores, se obtuvo una mortalidad del 24% al utilizar una concentración de 3% de taurocolato (Aho y cols., 1980). Utilizando una concentración de 4,5% se produjo la muerte del 71% de los animales empleados. En ambos casos, la mortalidad se producía en las primeras 72 h. Empleando una concentración del 5% se producía una mortalidad del 100% en las primeras 24 h (Aho y cols., 1980). Los resultados obtenidos por nuestro grupo son similares en cuanto a la mortalidad descrita por Aho, y así con una concentración del 3,5% hemos observado un 20% de mortalidad (Pereda y cols., 2004). Se trata de un modelo experimental en el cual la severidad y mortalidad dependen de la concentración y el volumen de la solución de sal biliar administrada, a diferencia de otros modelos experimentales como el de ceruleína. Los resultados que se obtienen, al utilizar una bomba de perfusión, son reproducibles en cualquier laboratorio

debidamente equipado, constituyendo un buen modelo para el estudio de la pancreatitis aguda grave. Es por tanto un modelo que tiende a causar una pancreatitis severa, cuya mortalidad se debe no sólo a los efectos locales, sino también a los efectos sistémicos precoces que provoca.

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

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

Histológicamente, se confirma un infiltrado inflamatorio pulmonar con formación de edema intersticial, además de engrosamiento de la pared alveolar y destrucción de la misma, resultando en un edema pulmonar característico del distrés respiratorio. Por tanto, nos encontramos con un modelo que se asemeja a la pancreatitis aguda grave de origen biliar en humanos, con una mortalidad similar y con efectos sistémicos caracterizados por una gran afectación a nivel pulmonar.

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

La obstrucción del conducto pancreático se acerca a la pancreatitis aguda producida por cálculos que dificultan la secreción normal del páncreas. La teoría del conducto común de Opie (Opie, 1901), que sugiere que las sales biliares son las responsables del inicio de la pancreatitis aguda cuando se

acumulan en el páncreas, ha sido cuestionada en los últimos años. El ligamiento del conducto pancreático sin reflujo de sales biliares procedentes del hígado desarrolla una pancreatitis indistinguible de la producida por el ligamiento que produce el conducto común bilio-pancreático (Lerch y cols., 1993).

2. LA HEMOGLOBINA EXTRACELULAR CONTRIBUYE A LAS COMPLICACIONES LOCALES Y SISTÉMICAS DE LA PANCREATITIS AGUDA.

Numerosas condiciones patológicas están relacionadas con las lisis de los eritrocitos y la liberación de la hemoglobina en los compartimentos extracelulares (Alayash, 2004; Subramanian y cols., 2013). La hemoglobina es una molécula altamente reactiva, que además de su función como proteína transportadora de oxígeno, interviene en múltiples procesos relacionados con los mecanismos fisiopatológicos de distintas enfermedades como la hipertensión sistémica y pulmonar, la aterosclerosis, la disfunción endotelial o la malaria (Rother y cols., 2005; Buehler y cols., 2010b).

La capacidad potencialmente tóxica de la hemoglobina extracelular es llevada a cabo por diferentes mecanismos interrelacionados. Uno de estos mecanismos se debe a la capacidad peroxidasa de la hemoglobina en presencia de H_2O_2 , creando un ambiente oxidativo responsable de la oxidación de proteínas y lípidos fundamentalmente (Kapralov y cols., 2009). Otro mecanismo de suma importancia para explicar los efectos tóxicos de la hemoglobina es la reacción con el óxido nítrico (NO). En esta reacción, la hemoglobina (Fe^{+2}) se transforma en metahemoglobina (Fe^{+3}) mientras que el NO da lugar a peroxinitrito ($ONOO^-$); de esta forma se produce un descenso en los valores de NO, explicando la vasoconstricción e hipertensión asociada a la presencia de hemoglobina libre o extracelular, y generando una molécula altamente reactiva como el peroxinitrito (Schaer y cols., 2013). A su vez, la metahemoglobina obtenida en esta reacción es muy susceptible de liberar el grupo hemino de su estructura. El grupo hemino es capaz de participar en dos reacciones que potenciarían el efecto tóxico de la hemoglobina. Por un lado, puede oxidar directamente a diferentes estructuras biológicas como las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y por otro, puede reaccionar con diferentes receptores celulares como TLR4, amplificando la respuesta inflamatoria (Figueiredo y cols., 2007).

La pancreatitis aguda experimental inducida por perfusión intraductal de taurocolato sódico se caracteriza por desarrollar una pancreatitis de tipo necrohemorrágico (Aho y cols., 1980). En este tipo de pancreatitis experimental en ratas se produce la necrosis isquémica y hemorrágica de gran parte del parénquima pancreático, además de la extravasación de fluidos a la cavidad peritoneal debido a cambios en la permeabilidad capilar, dando lugar a un líquido ascítico hemorrágico (Lehtola, 1986; Vollmar y cols., 1992).

En base a estos antecedentes, el primer objetivo del trabajo consistió en estudiar la posible existencia de hemoglobina extracelular, procedente de la lisis de los glóbulos rojos, en un medio rico en enzimas proteolíticas y lipolíticas como el líquido ascítico asociado a pancreatitis aguda (Rämö y cols., 1987).

2.1. La hemólisis en el líquido ascítico asociado a pancreatitis aumenta los niveles de hemoglobina extracelular y la actividad peroxidasa en plasma.

Para iniciar el estudio de la posible presencia de hemoglobina en el líquido ascítico asociado a pancreatitis, se escogió una técnica de elevada fiabilidad como es la espectrometría de masas con analizador MALDI-TOF. Los resultados obtenidos, empleando previamente una separación proteica de muestras de ascitis mediante electroforesis, confirmaron la presencia de la globina β , subunidad polipeptídica de la molécula de hemoglobina. En esta identificación, a su vez, se comprobó la actividad peroxidasa que puede ejercer la hemoglobina (Kapralov y cols., 2009). Para llevar a cabo el estudio de la actividad peroxidasa de la hemoglobina, se efectuó la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa, tras la realización de la electroforesis de las muestras de ascitis. En esta membrana se añadió directamente el reactivo luminol, sin previa incubación de la membrana con un anticuerpo conjugado a peroxidasa, para comprobar si era capaz de emitir quimioluminiscencia. Al revelar la membrana, se observaron bandas que emitieron luminiscencia a diferentes pesos moleculares, constatando la actividad peroxidasa relacionada con la globina β . La aparición de este patrón proteico con diferentes bandas luminiscentes se debe al fraccionamiento de la molécula de hemoglobina en las distintas cadenas polipeptídicas que componen su estructura, causado por el proceso de desnaturalización previo al que son sometidas las muestras durante la realización de la electroforesis. Estas bandas coinciden con los pesos moleculares de la globinas y sus dímeros.

Una vez confirmada la presencia y la actividad peroxidasa de la hemoglobina en el líquido ascítico, nos planteamos si su origen es debido a la capacidad hemolítica que podía ejercer este fluido biológico sobre eritrocitos procedentes de la extravasación de sangre a la cavidad peritoneal durante los procesos iniciales de la enfermedad (Lehtola, 1986; Vollmar y cols., 1992). La ascitis, o cualquier otro fluido derivado de la lesión del parénquima pancreático, es un medio rico en enzimas digestivas con capacidad para hidrolizar los diferentes enlaces de las biomoléculas del organismo, y por tanto, con capacidad para dañar a las distintas estructuras celulares (Rämö y cols., 1987; Navarro y cols., 2002). Al incubar líquido ascítico procedente de rata con PA, libre de elementos celulares, con una fracción de glóbulos rojos obtenidos de

sangre de la misma rata, se obtuvo una concentración de hemoglobina extracelular prácticamente igual a la hallada en el lisado total de los eritrocitos empleados. De acuerdo con nuestros resultados, la capacidad hemolítica de la ascitis se debe previsiblemente a la acción de las enzimas lipolíticas. La adición de inhibidores de proteasas, previa a la incubación, no modificó los niveles de hemoglobina extracelular obtenidos sin la presencia de estos inhibidores.

Los datos obtenidos en estos primeros experimentos constataron el objetivo inicial de este estudio, que era que la pancreatitis aguda experimental necrotizante puede originar la presencia de hemoglobina extracelular en la cavidad peritoneal debido a la acción hemolítica del líquido ascítico. En este punto, habría que destacar que la pancreatitis aguda severa a nivel clínico no suele cursar con la producción de líquido ascítico (Navarro y cols., 2002). Sin embargo, debido a que los resultados sugieren que la capacidad hemolítica es fruto de la concentración elevada de enzimas lipolíticas, cualquier colección o fluido de origen pancreático durante el transcurso de la enfermedad puede ser responsable de la hemólisis y como consecuencia, de la existencia de hemoglobina extracelular en la cavidad peritoneal. De hecho, los fluidos de origen pancreático suelen tener un color rojizo.

Una vez identificada la hemoglobina y su actividad peroxidasa, nos planteamos conocer la evolución que tendrían sus niveles en el líquido ascítico durante el desarrollo de la pancreatitis aguda. La concentración de hemoglobina extracelular en la ascitis alcanzó un pico de concentración en la primera hora tras la inducción de la enfermedad, desde ese punto los niveles descendieron marcadamente durante el transcurso de la pancreatitis aguda. Para justificar esta disminución, se determinaron los valores de uno de los productos de su metabolismo en la ascitis, la bilirrubina. Como era de esperar, los valores de este metabolito en el líquido ascítico aumentaron paulatinamente durante la pancreatitis, conforme disminuían los de hemoglobina. Este incremento en los valores de bilirrubina vendría motivado por los mecanismos responsables de la regulación de la concentración de hemoglobina en condiciones extracelulares. En primer lugar, la unión covalente a la haptoglobina y posteriormente, la acción metabólica de los macrófagos a través del receptor CD163 (Subramanian y cols., 2013). No obstante, en presencia de H_2O_2 , el complejo haptoglobina-hemoglobina (Hp-Hb) puede seguir desarrollando actividades vasoactivas y oxidantes a través de la interacción con el NO y a la capacidad peroxidasa respectivamente (Kapralov y cols., 2009). Al determinar la actividad peroxidasa en el líquido ascítico a diferentes tiempos tras la inducción de la enfermedad, observamos que el perfil obtenido coincidía exactamente con el hallado al cuantificar la concentración de hemoglobina. De esta forma, se pone de manifiesto que en situaciones

patológicas como la pancreatitis aguda, la hemoglobina es capaz de desarrollar sus efectos deletéreos, debido fundamentalmente a que los mecanismos reguladores son insuficientes (Buehler y D'Agillo, 2010a), y también como consecuencia de las propiedades bioquímicas anteriormente citadas del complejo Hp-Hb (Kapralov y cols., 2009).

Como hemos mencionado, el aumento de la concentración de bilirrubina en el líquido ascítico podría dar explicación a la disminución de los niveles de hemoglobina en este fluido en el transcurso de pancreatitis aguda, causado principalmente por la degradación de la misma en el interior de los macrófagos. Otro proceso que podría dar explicación a este descenso podría ser la reabsorción de la hemoglobina desde el líquido ascítico a la circulación sanguínea a través de los capilares peritoneales. Los resultados obtenidos al estudiar la concentración de hemoglobina en el plasma de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda mostraron un aumento progresivo de la concentración de la misma en el transcurso de la enfermedad, alcanzando el máximo de concentración a las seis horas de la enfermedad, y no experimentando un descenso tan acusado como sucedía en las muestras de ascitis analizadas. La aparición de este pico a las seis horas tras la inducción significaría un retraso frente al máximo alcanzado en el líquido ascítico. Además, la concentración de hemoglobina extracelular fue sensiblemente menor en plasma que en ascitis, indicando, junto al dato anterior, que probablemente el origen de la hemoglobina extracelular sucede en el líquido ascítico.

También se determinaron la concentración de bilirrubina y la actividad peroxidasa en el plasma de las ratas con pancreatitis aguda. Conforme avanza la enfermedad, los niveles de bilirrubina en plasma aumentan ligeramente, evidenciando el metabolismo de la hemoglobina. Sin embargo, la leve disminución de los niveles de hemoglobina a partir de las seis horas de la inducción y el aumento de los niveles de su metabolito en plasma, no se tradujo en la desaparición total de la actividad peroxidasa, dato que coincide con el obtenido en el líquido ascítico.

En resumen, la pancreatitis aguda inducida por perfusión intraductal de taurocolato sódico en ratas *Wistar* aumenta los niveles de hemoglobina extracelular en plasma, y como consecuencia, produce un incremento en la actividad peroxidasa, relacionada con los posibles efectos nocivos que puede llevar a cabo la hemoglobina fuera del eritrocito. A su vez, comprobamos que esta hemoglobina encontrada en plasma podía tener su origen en la capacidad hemolítica del líquido ascítico, probablemente en la naturaleza lipolítica de su composición enzimática. En este fluido también se halló actividad peroxidasa, sugiriendo que las propiedades vasoactivas y oxidantes que puede ejercer la

hemoglobina en condiciones extracelulares pueden tener repercusión tanto a nivel local como sistémico en la evolución de la pancreatitis aguda.

2.2. Papel de la hemoglobina extracelular en la respuesta inflamatoria local en la pancreatitis aguda.

En base a estos resultados, el estudio se centró en el papel que podría desempeñar la hemoglobina extracelular, presente en el líquido ascítico, en la evolución de la respuesta local y sistémica de la pancreatitis aguda. Para llevar a cabo este estudio, se inyectó intraperitonealmente hemoglobina de rata, purificada mediante cromatografía de intercambio iónico, a un grupo de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda inducida por taurocolato.

Los primeros resultados obtenidos mostraron la participación de la hemoglobina en los fenómenos locales de la pancreatitis aguda. A las seis horas de la inducción, el volumen de ascitis generado, tras la inyección de hemoglobina, fue considerablemente mayor comparado con el grupo de pancreatitis aguda sin inyección de hemoglobina. Este incremento en la producción de líquido ascítico puede ser debido al efecto de la hemoglobina libre sobre la permeabilidad de las células endoteliales a través de la activación de NF- κ B y del factor inducible por hipoxia (HIF) (Lisk y cols., 2013). En la pancreatitis aguda experimental, la ascitis está relacionada con la severidad de la enfermedad, ya que desempeña un papel clave en la patogénesis de la pancreatitis aguda. El líquido ascítico eleva la producción de TNF- α por las células acinares (Ramudo y cols., 2005), promueve la activación de los macrófagos (Sato y cols., 1999; Gutiérrez y cols., 2008) e induce daño pulmonar (Fujita y cols., 2001) y muerte celular de los hepatocitos (Murr y cols., 2002). De hecho, la ascitis promueve la activación de NF- κ B y aumenta la producción de TNF- α en los macrófagos peritoneales (Sato y cols., 1999). Además, el extracto lipídico del líquido ascítico reduce el efecto antiinflamatorio del 15-deoxi-PGJ₂ como agonista de PPAR γ , cofactor de transcripción relacionado con la inhibición de la inflamación (Gutiérrez y cols., 2008).

A nivel pancreático, se estudió la influencia que la hemoglobina extracelular podría ejercer en el estado redox e inflamatorio del tejido pancreático en la pancreatitis aguda. Para valorar el papel de la hemoglobina, molécula con actividad peroxidasa, en el estado antioxidante del páncreas, se determinaron los niveles de glutatión reducido (GSH). La depleción de GSH es una característica de la pancreatitis aguda y los bajos niveles de este antioxidante intracelular mayoritario están asociados con un aumento de la mortalidad y del daño tisular (Gómez-Cambronero y cols., 2000; Alsfasser y cols., 2002). La administración de hemoglobina no produjo cambios en los niveles de GSH tras inducción de PA, evidenciando que la liberación de

hemoglobina extracelular es seguramente consecuencia de la pancreatitis y por tanto, no parece contribuir a los procesos iniciales de la enfermedad en las células acinares.

Acompañando al estudio de los niveles de GSH en páncreas, se analizó la expresión de genes relacionados con la inflamación, para observar si la hemoglobina de la ascitis podía regular la cascada inflamatoria a nivel pancreático, asociada a la inducción de la enfermedad (Sendler y cols., 2013). Se escogieron cinco genes, *inos*, *ho-1*, *il-1 β* , *il-6* e *il-10* como marcadores de inflamación en el tejido pancreático, y cuya expresión está aumentada tras la inducción de la pancreatitis aguda en el mismo (Jung y cols., 2010). A pesar de las propiedades inflamatorias de la hemoglobina, a través de la interacción del grupo hemino con los receptores TLR4 (Figueiredo y cols., 2007), a excepción de la *il-6*, el resto de genes analizados no experimentaron un aumento en la expresión tras la inyección intraperitoneal de la hemoglobina y transcurridas seis horas tras la inducción. Los resultados de expresión de estos genes ratificaron los datos obtenidos tras estudiar los niveles de GSH en páncreas. La hemoglobina liberada en el líquido ascítico, pese a sus propiedades oxidativas e inflamatorias (Schaer y cols., 2013), no parece contribuir al daño del tejido pancreático en la evolución de la pancreatitis aguda.

2.3. La hemoglobina extracelular interviene en el desarrollo de las complicaciones sistémicas de la pancreatitis aguda.

Una vez conocido el papel de la hemoglobina extracelular en la evolución local de la enfermedad, el siguiente objetivo del trabajo se centró en estudiar el alcance sistémico y la relación que pueden tener sus propiedades con la evolución de la pancreatitis aguda.

En primer lugar, se analizó si la administración de hemoglobina purificada mediante inyección intraperitoneal a ratas con pancreatitis aguda se traduciría en un aumento de la concentración de hemoglobina libre en el líquido ascítico y en el plasma. Hay que destacar que las concentraciones elevadas de hemoglobina extracelular en plasma se relacionan con un incremento en el riesgo de mortalidad de pacientes hospitalizados por sepsis (Janz y cols., 2013), enfermedad que se caracteriza por un desarrollo sistémico similar al de la pancreatitis aguda (Nystrom, 1998). La concentración de hemoglobina en el líquido ascítico y en el plasma de ratas con pancreatitis aguda aumentó tras la adición de la hemoglobina, confirmando el origen ascítico de la hemoglobina extracelular asociada a pancreatitis en plasma. Parte de esta hemoglobina es

metabolizada, como evidencian los niveles de bilirrubina total y conjugada hallados en plasma a las seis horas de la inducción de la pancreatitis aguda.

No obstante, como se ha indicado anteriormente, los mecanismos defensivos suelen ser insuficientes a la hora de frenar los posibles efectos tóxicos de la proteína en condiciones extracelulares (Kapralov y cols., 2009). La actividad prooxidante de la hemoglobina extracelular se evaluó mediante la determinación en plasma de dos parámetros de peroxidación lipídica, el malondialdehído (MDA) y uno de los isoprostanos más representativos, el 15-isoprostano F_{2t} (Reeder y cols., 2004; Buehler y cols., 2012). Ambos marcadores vieron incrementados sus niveles tras la administración de hemoglobina a ratas con inducción previa de pancreatitis, manifestando la participación de la hemoglobina libre en la formación de peróxidos lipídicos en la pancreatitis aguda a nivel sistémico. Además, estos productos de peroxidación lipídica no sólo cumplen función como marcadores de estrés oxidativo sistémico, sino que su presencia en plasma se relaciona con numerosas enfermedades, fundamentalmente cardiovasculares, ejerciendo una función como mediadores fisiopatológicos de daño oxidativo. Se ha comprobado que niveles altos de MDA en suero están asociados con la severidad de la PA en fases iniciales de la enfermedad (Hernández y cols., 2011). Respecto a los isoprostanos, desarrollan una acción vasoconstrictora a nivel renal y pulmonar fundamentalmente, mediada por la activación de los receptores de tromboxano A2 (Takahashi y cols., 1992, Delannoy y cols., 2010). La hipertensión pulmonar es la complicación más frecuente asociada a la hemoglobina libre tras un episodio hemolítico (Zhang y cols., 2007; De Castro y cols., 2008; Schaer y cols., 2013), siendo la hemoglobina extracelular capaz de producir un aumento en la presión de la arteria pulmonar (Buehler y cols., 2012). Uno de los mecanismos que puede contribuir a esta hipertensión puede ser el incremento de 15-isoprostano F_{2t} observado en este estudio, debido a su potente acción vasoconstrictora a nivel del músculo liso pulmonar (Liu y cols., 2007; Dromparis y Michelakis, 2012).

A continuación, tras comprobar que la hemoglobina libre es capaz de desarrollar su capacidad peroxidasa en plasma durante la pancreatitis aguda, nos planteamos estudiar los valores de GSH, como indicador de defensa antioxidante, en tejidos relacionados con las complicaciones sistémicas de la enfermedad.

Se observó una depleción de los niveles de GSH en el tejido adiposo tras la inducción de la pancreatitis aguda, que fue similar tras la administración de hemoglobina. La hemoglobina extracelular se asocia con una depleción de los niveles de GSH (D'Agnillo y Alayash, 2000). A su vez, la concentración de GSH, como molécula antioxidante, se ha relacionado con la resistencia a la

muerte celular (Higuchi y cols. 2004). Como se ha señalado anteriormente, la hemoglobina extracelular puede causar estrés oxidativo y citotoxicidad debido a su actividad peroxidasa, generando radicales libres, como anión superóxido, radical hidroxilo y peróxidos lipídicos entre otros (Alayash, 2004; Kapralov y cols., 2009). Además, la hemoglobina es capaz de reaccionar con el NO y formar una molécula muy reactiva como es el peroxinitrito (Schaer y cols., 2013). Este derivado del NO tiene capacidad prooxidante, pudiendo reaccionar con las diferentes biomoléculas del organismo, ocasionando daño celular por disfunción mitocondrial y/o por pérdida de la integridad del ADN, originando la muerte celular en última instancia (Calcerrada y cols., 2011). La acción de los radicales libres y la producción de peroxinitrito, junto a la isquemia secundaria a la vasoconstricción por descenso en los niveles de NO (Schaer y cols., 2013), podría deteriorar la capacidad reductora y antioxidante de las células del tejido adiposo, y además generar un estado hipóxico responsable de causar la muerte por necrosis del tejido.

La determinación de GSH en el tejido hepático mostró un perfil similar al obtenido en el estudio del tejido adiposo. Sin embargo, los niveles de GSH en pulmón no experimentaron cambios significativos frente a las concentraciones basales. La diferencia en el estado oxidativo de estos dos tejidos, tras la inducción de la pancreatitis aguda, podría ser debida a que el hígado es un órgano que se encuentra en la cavidad peritoneal y por tanto, puede tener contacto directo con sustancias permeables del líquido ascítico. Al comparar los valores de la actividad peroxidasa en ascitis frente a los hallados en plasma, se observa que esta actividad es del orden de unas 30 veces mayor en el líquido ascítico que en el plasma, y como consecuencia, la formación de especies prooxidantes será mucho mayor. De esta manera, es posible pensar que el líquido ascítico, debido a esa potente actividad peroxidasa, es capaz de alterar el estado redox de los tejidos en contacto con él y causar un daño independiente de la liberación de citoquinas en hígado, como describió Murr en el 2002 (Murr y cols., 2002).

La hemoglobina libre asociada a hemólisis ha sido relacionada con la infiltración leucocitaria y con el incremento de marcadores inflamatorios a través de las propiedades proinflamatorias del grupo hemino (Davenport y Kunkel, 1994; Wun, 2001; Figueiredo y cols., 2007). Estas propiedades están asociadas a la producción del leucotrieno B4 (LTB4) en los macrófagos (Monteiro y cols., 2011), a la activación del receptor de la proteína G (Porto y cols., 2007) o a la inducción de necrosis en los macrófagos a través de la expresión de TNF- α vía TLR4/Myd88 o mediante la generación de ERO vía TLR4 independiente (Fortes y cols., 2012).

Para la caracterización de la respuesta inflamatoria en los diferentes tejidos, se analizó la expresión de genes relacionados con la inflamación y con el metabolismo de la hemoglobina. Se estudiaron *inos* y *ho-1*, y cuatro citoquinas, *tnf- α* , *il-1 β* , *il-6* e *il-10*. Recientemente, se ha descrito que la liberación del grupo hemino en condiciones patológicas aumenta la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 a través de la translocación de NF- κ B, y la expresión génica de *inos* y *ho-1* en macrófagos alveolares (Simões y cols., 2013).

La expresión de *inos* y *ho-1* en el tejido adiposo está elevada tras la inducción de la pancreatitis aguda, indicando el posible estrés nitrosativo y la respuesta al daño por el aumento de la concentración de hemoglobina libre. Tras la administración de hemoglobina, sólo aumentó la expresión de *ho-1*, responsable del metabolismo de la hemoglobina para intentar reducir los efectos tóxicos de la misma. Los resultados más interesantes se obtuvieron al analizar la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias, *tnf- α* , *il-1 β* e *il-6* y la citoquina antiinflamatoria, *il-10*. La expresión de las cuatro citoquinas aumentó en el tejido adiposo a las seis horas de la inducción de la pancreatitis aguda, seguramente como consecuencia de la respuesta inflamatoria originada por los distintos mediadores liberados tras la inducción de la enfermedad en el páncreas (Luan y cols., 2013). La administración de hemoglobina aumentó la expresión de *tnf- α* , *il-1 β* e *il-6* y provocó un descenso en la expresión de *il-10*. Resultados que coinciden con los hallados por Simões y colaboradores en macrófagos alveolares, respecto a la regulación de la producción de citoquinas mediante el grupo hemino de la hemoglobina (Simões y cols., 2013).

El análisis de la expresión de estos genes sugiere que la hemoglobina extracelular de la ascitis participa en la regulación y amplificación de la cascada inflamatoria en el tejido adiposo. La sobreexpresión de las citoquinas proinflamatorias, especialmente TNF- α , puede contribuir a la necrosis del tejido a través de la interacción con receptores de membrana implicados en la muerte celular (Saldeen y cols., 2000; Chu, 2013).

Estos resultados explicarían que las áreas de necrosis grasa asociadas a pancreatitis son mucho más abundantes tras la administración de hemoglobina. A su vez, la formación de estas lesiones en el tejido adiposo podría contribuir al desarrollo sistémico de la enfermedad. Recientemente, Closa y colaboradores han observado que estas áreas son una importante fuente de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , tienen baja expresión de la IL-10 antiinflamatoria y contienen un intenso infiltrado inflamatorio, particularmente neutrófilos (Franco-Pons y cols., 2010). Por tanto, los macrófagos peritoneales están fuertemente activados en presencia de tejido adiposo blanco necrótico (Franco-Pons y cols., 2010). Además, la necrosis grasa abdominal puede contribuir a la

respuesta inflamatoria sistémica en la pancreatitis aguda mediante la liberación de lípidos halogenados (Franco-Pons y cols., 2013).

En resumen, de acuerdo con nuestros resultados, bien la hemoglobina o bien el grupo hemino procedente de la hemoglobina asociada a hemólisis contribuyen a la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo durante la pancreatitis aguda. Este estado pro-inflamatorio, acompañado de la disminución de la capacidad antioxidante observada en la depleción de GSH en este tejido, puede ser origen de la necrosis grasa. Además, la formación de necrosis grasa se caracteriza por la activación e infiltración leucocitaria, y también por la liberación de mediadores inflamatorios (Franco-Pons y cols., 2010), perpetuando la cascada inflamatoria iniciada por la hemoglobina, y como consecuencia, contribuyendo a las complicaciones sistémicas de la pancreatitis aguda.

Respecto al hígado, el comportamiento de la expresión de los genes *inos* y *ho-1* fue igual al obtenido en el tejido adiposo. Tras la adición de hemoglobina libre, no se obtuvieron cambios en la expresión de *inos* y sí en la expresión de *ho-1*. Destacar que los niveles de ARNm relativos de estos dos genes en el hígado, aun siendo valores muy elevados, fueron menores que los obtenidos en tejido adiposo, sugiriendo una menor afectación del hígado respecto al tejido adiposo en la pancreatitis aguda necrótica. De nuevo, la sobreexpresión de *ho-1*, tras la administración de la hemoglobina, pone de manifiesto la activación de los mecanismos detoxificantes por la presencia del grupo hemo, como sucedía en el tejido adiposo. Sin embargo, al analizar los niveles de expresión en hígado de *tnf- α* , *il-1 β* , *il-6* e *il-10*, observamos que los valores de ARNm de las citoquinas no se modificaron en ninguna de las condiciones experimentales. Respecto a este resultado, destacaríamos que la afectación hepática directa en la pancreatitis aguda suele ser baja, con estudios contradictorios al respecto. Parece que la importancia del hígado radica en su participación en los efectos sistémicos, como por ejemplo, el aumento que produce de fosfolipasa A₂ y su contribución a la afectación pulmonar (Closa y cols., 1996; Closa y cols., 1999). Además, los estudios donde se analiza el daño hepático y la producción de citoquinas utilizan una concentración de taurocolato sódico del 5% (Vaquero y cols., 2001; Wenhong y cols., 2012), frente al 3,5% empleado en este trabajo.

El análisis de los genes relacionados con la inflamación finalizó con el estudio en el pulmón. La expresión de *ho-1* en el pulmón siguió el mismo comportamiento que el observado en tejido adiposo e hígado. Sin embargo, los niveles de ARNm de *ho-1* en pulmón no fueron tan elevados como en estos dos tejidos, seguramente debido a que está alejado del líquido ascítico y sólo recibe el grupo hemo a través de la circulación sanguínea, que tiene niveles menores. Aun así, la sobreexpresión demuestra la presencia del grupo hemo

en el tejido pulmonar en la pancreatitis aguda. El componente inflamatorio se analizó mediante la expresión de las citoquinas *tnf- α* , *il-1 β* , *il-6* e *il-10*. Los resultados obtenidos mostraron una activación de la expresión de todas ellas tras la inducción de la pancreatitis, no siendo esta activación dependiente de la hemoglobina en el tejido pulmonar. Por último, destacar el perfil observado en la expresión de *inos* en el pulmón. Como sucedía en páncreas, tejido adiposo e hígado, la inducción de la pancreatitis aguda se tradujo en un aumento de la expresión de *inos* a las seis horas desde la perfusión de taurocolato sódico. El resultado más interesante se produjo tras la adición de hemoglobina purificada a ratas con pancreatitis aguda. A diferencia de los otros tejidos estudiados, la expresión de *inos* prácticamente se duplicó en pulmón respecto al grupo de pancreatitis aguda sin administración de hemoglobina.

En la pancreatitis aguda, la sobreproducción en pulmón de NO a través de la enzima iNOS está relacionada con la aparición de daño pulmonar agudo (Cheng y cols., 2010). La expresión génica de la enzima *inos* en el pulmón es un parámetro empleado habitualmente como marcador de inflamación tisular y asociado a enfermedades pulmonares como el asma (Hamid y cols., 1993), el cáncer pulmonar (Tauler y Mulshine, 2009) o el fallo pulmonar agudo (D'Alessio y cols., 2012). En todas estas patologías, la regulación de la expresión de *inos* depende fundamentalmente de la activación del factor de transcripción NF- κ B a través de los receptores CD14 o los receptores de IL-1 β (Schröder y cols., 2000). Sin embargo, en condiciones de hipoxia, el factor de transcripción inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α) puede regular el control de la expresión de *inos*, como sucede en el shock hemorrágico (Hierholzer y Billiar, 2001). Recientemente, se ha publicado que la hemoglobina extracelular es capaz de inducir la expresión de HIF-1 α a través de los receptores TLR y modificar la permeabilidad de las células endoteliales (Lisk y cols., 2013). Además, HIF-1 α juega un papel importante en el fallo pulmonar agudo (Craig y Dorscheid, 2002), y su inhibición está relacionada con la disminución de la afectación pulmonar (Jiang y cols., 2012).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos preguntamos si la sobreexpresión de *inos* hallada en el pulmón podía ser debida a la contribución de HIF-1 α en la aparición del daño pulmonar asociado a pancreatitis aguda. Para caracterizar la participación de HIF-1 α en pulmón, se analizó la expresión génica de tres dianas, el factor de crecimiento endotelial vascular a (*vegfa*), la óxido nítrico sintasa endotelial (*enos*) y la *hexoquinasa-2* (*hk-II*), además de la *ho-1* ya estudiada. La expresión de *vegfa*, *enos* y *hk-II* en pulmón experimentó el mismo perfil que las otras dos dianas de HIF-1 α estudiadas, *inos* y *ho-1*. Los resultados sugieren una participación de HIF-1 α en el daño pulmonar secundario a la pancreatitis aguda y mediada por la presencia de hemoglobina libre en los vasos pulmonares.

Para comprobar que la activación de HIF-1 α era específica de la región pulmonar en la pancreatitis aguda, se estudiaron de nuevo los genes dianas de HIF-1 α en hígado. Los niveles de expresión de *vegfa*, *enos* y *hk-II* en hígado mostraron que HIF-1 α no se activa en el tejido hepático durante la pancreatitis aguda.

Entre las dianas de HIF-1 α escogidas, VEGFA es capaz de alterar la permeabilidad vascular del agua y proteínas en diferentes órganos, fundamentalmente en el pulmón (Mura y cols., 2004), estando regulado el proceso por las especies reactivas del oxígeno (Irwin y cols., 2009). Además, la sobreexpresión de *vegfa* en pulmón induce edema pulmonar (Kaner y cols., 2000), y a nivel sistémico, modifica la permeabilidad capilar en diversos órganos (Thurston y cols., 1999). En las fases iniciales del daño pulmonar asociado a la respuesta inflamatoria aguda, las células epiteliales alveolares y los leucocitos liberan VEGFA, aumentando la permeabilidad de la capa endotelial y contribuyendo a la formación del edema intersticial de pulmón (Mura y cols., 2004). También destaca la capacidad quimiotáctica de VEGFA (Barleon y cols., 1996), propiedad que puede explicar el aumento de actividad mieloperoxidasa pulmonar encontrado en nuestro estudio tras la administración de hemoglobina libre a ratas con pancreatitis aguda.

Observando la importancia que VEGFA puede desempeñar en la evolución del edema pulmonar asociado a pancreatitis, junto a los niveles de expresión génica anteriormente analizados, también se determinaron los niveles proteicos, mediante *Western-blot*, de VEGFA en pulmón e hígado. Tras la inducción de la pancreatitis aguda, los niveles de proteína aumentaron en ambos tejidos. La inyección intraperitoneal de hemoglobina causó un incremento proteico de VEGFA exclusivamente en pulmón, manifestando la especificidad de la hemoglobina en la regulación de VEGFA a nivel pulmonar en la pancreatitis aguda. Todos estos resultados apoyan la hipótesis de Lagan sobre la contribución de la hemoglobina extracelular al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y como consecuencia, al fallo pulmonar agudo (Lagan y cols., 2008).

En conclusión, la hemoglobina extracelular contribuye al desarrollo de la pancreatitis aguda a través del incremento del volumen de líquido ascítico, de la formación de necrosis grasa y además, por el aumento de expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el tejido adiposo abdominal y de VEGFA en el pulmón. Por tanto, los efectos pro-inflamatorios inducidos por la hemoglobina extracelular en el tejido adiposo abdominal, junto con el aumento de ascitis y la activación de HIF-1 α en el pulmón, pueden contribuir de una manera decisiva a la respuesta inflamatoria sistémica y al fallo pulmonar agudo en la pancreatitis aguda necrotizante.

3. LAS RATAS OBESAS PRESENTAN MAYORES NIVELES DE NECROSIS GRASA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN LA PANCREATITIS AGUDA.

La obesidad es un factor pronóstico de severidad en la evolución de la pancreatitis aguda, ya que las complicaciones sistémicas son más frecuentes en pacientes obesos que en no obesos (Amman y cols., 2010). Los pacientes con pancreatitis aguda severa tienen mayor porcentaje de grasa corporal que los pacientes con pancreatitis aguda leve (Funnell y cols., 1993; Martínez y cols., 2004), siendo el tejido adiposo abdominal un factor de riesgo independiente en la aparición de la enfermedad (Sadr-Azodi y cols., 2013). Además, también se ha demostrado en distintos meta-análisis que la obesidad es un factor de riesgo de desarrollo de complicaciones locales y sistémicas en la pancreatitis aguda (Martínez y cols., 2006; Chen y cols., 2012).

En el modelo experimental de pancreatitis aguda necrótica inducida por taurocolato, se ha observado que las ratas obesas *Zucker* tienen un porcentaje de supervivencia marcadamente inferior a las controles (Segersvärd y cols., 2001). Experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio con estas ratas obesas corroboran estos hallazgos. No obstante, la hiperlipidemia y la mayor grasa abdominal, por sí solas, no dan lugar a una mayor mortalidad o lesión pancreática en la pancreatitis aguda necrótica (Segersvärd y cols., 2001). En consecuencia, todavía no se conocen bien los mecanismos responsables de la mayor severidad de la pancreatitis aguda experimental en animales obesos.

Las ratas *Zucker* presentan el receptor de la leptina mutado con el fin de producir obesidad. En estudios clínicos, se ha observado que la leptina juega un papel clave en la regulación de la ingesta y el consumo energético (Mockus, 2001). Analizando la ingesta de comida y agua, se puede concluir que este aumento de peso se produce como consecuencia de una mayor ingesta de comida. Por tanto, nuestros resultados indican que la mutación en el receptor de la leptina produce obesidad por hiperfagia tal como demuestran otros autores (Senello y cols, 2008).

Una vez se ha comprobado que la diferencia de peso entre ambos grupos era significativa, realizamos estudios para comprobar si el peso corporal está relacionado con el peso del páncreas con el fin de ajustar la dosis de taurocolato perfundida. Este punto es de especial importancia si queremos inducir una pancreatitis aguda comparable tanto en ratas obesas como en ratas control. Hemos observado que el páncreas presenta un peso similar en ambos grupos, por lo que la dosis de taurocolato empleada para inducir la pancreatitis

aguda experimental fue la misma, y podemos deducir que la inducción de pancreatitis será similar en ambos grupos. Este modelo de estudio ha sido realizado de la misma manera por otros grupos de investigación (Segersvärd y cols., 2001).

3.1. Papel del estrés oxidativo y los isoprostanos en la pancreatitis aguda y en la obesidad.

Durante las últimas décadas, diversos autores han mostrado evidencias indirectas de que el estrés oxidativo juega un papel importante en la pancreatitis aguda (Sanfey y cols., 1984; Guice y cols., 1986; Schönberg y cols., 1991). En este trabajo hemos estudiado la posible contribución del estrés oxidativo, local y sistémico, en el incremento de la severidad de la pancreatitis en los animales obesos. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) a altas concentraciones son citotóxicas, pudiendo causar necrosis, mientras que a bajas concentraciones pueden desempeñar una función como mensajeros de señalización, contribuyendo también al proceso inflamatorio (Pereda y cols., 2006; Baggaley y cols., 2008; Escobar y cols., 2009). De hecho, las actividades prooxidantes de la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa son mediadoras de la respuesta inflamatoria y del daño tisular en la pancreatitis (Niederau y cols., 1996; Gukovskaya y cols., 2002; Yu y cols., 2005). Sin embargo, el papel de las ERO en la pancreatitis es controvertido porque pueden ser beneficiosas durante el desarrollo de la enfermedad por activar la vía apoptótica, tras estimulación de las células acinares por ceruleína o colecistoquinina (Odinokova y cols., 2009). Además, se ha descrito que las ERO originadas por la presencia de ácidos biliares desencadenan la apoptosis, protegiendo a las células acinares contra la necrosis (Booth y cols., 2011).

En el presente trabajo, hemos observado que los niveles de GSH pancreáticos en condiciones basales y a las seis horas de la inducción son más bajos en las ratas obesas que en ratas control. Por tanto, este descenso en la defensa antioxidante puede, por sí mismo, contribuir al incremento del daño pancreático en las ratas obesas. También hemos encontrado que el glutatión oxidado (GSSG) alcanzó una magnitud mayor en el páncreas del grupo de las ratas obesas, demostrando la presencia de estrés oxidativo en el páncreas de animales obesos con pancreatitis. Adicionalmente, observamos que el descenso en las actividades de las serín/treonín fosfatasas PP1 y PP2A y de las tirosín fosfatasas, sensibles al estado redox, en páncreas durante la pancreatitis, fue más pronunciado en los animales obesos. Estas proteínas fosfatasas pueden ser inactivadas por estrés oxidativo (Pereda y cols., 2006; de Dios y cols., 2006; Escobar y cols., 2009), y su inactivación está implicada en la formación del edema pancreático y en la regulación de TNF- α

(Schnekenburger y cols., 2005; de Dios y cols., 2006). En consecuencia, la menor actividad encontrada en el páncreas de las obesas puede llevar al aumento de la actividad de las MAP quinasas y de la inducción de citoquinas proinflamatorias, explicando en parte los altos niveles de estas últimas en las ratas obesas, publicado previamente por Segersvärd y colaboradores (Segersvärd y cols., 2001; 2008).

La vía de la transulfuración fue estudiada en el tejido pancreático por su participación en la síntesis de cisteína, aminoácido cuyos niveles son el factor limitante para la formación de GSH. Por tanto, modificaciones en esta vía podrían contribuir a la depleción de GSH durante la pancreatitis y particularmente a la baja concentración basal encontrada en las ratas obesas. De acuerdo con nuestros resultados, la vía de la transulfuración no es la responsable del descenso de GSH en la pancreatitis, debido a que no hay descenso en los niveles de cisteína. En contraste, los niveles pancreáticos de la forma oxidada de la cisteína, la cistina, aumentan marcadamente después de la inducción de la pancreatitis, probablemente como resultado de la hidrólisis del GSH por las proteasas pancreáticas y debido al ambiente prooxidante originado por la pancreatitis aguda. Es importante destacar a la S-adenosil metionina (SAM), uno de los metabolitos clave en la vía de la transulfuración. Los niveles de SAM fueron muy superiores en el grupo de las ratas obesas, en condiciones basales, y sufrían un descenso brusco tras la inducción de la pancreatitis en ambos grupos. La depleción de estos niveles en la pancreatitis aguda fue publicada por Lu (Lu y cols., 2003), empleando como modelo experimental la pancreatitis inducida por dieta deficiente en colina y con suplemento en etionina. El papel crítico del SAM como donante de grupos metilo puede determinar una regulación específica de la expresión de genes en el páncreas de animales obesos a través de la metilación de islas CpG o histonas. Futuros experimentos son necesarios para clarificar la función del SAM durante el transcurso de la enfermedad y en la obesidad.

Respecto a la peroxidación lipídica, se determinaron los niveles de malondialdehído (MDA) y 15-isoprostano F_{2t} (Reeder y cols., 2004; Buehler y cols., 2012). La concentración de MDA fue más alta en condiciones basales en el plasma de los animales obesos. Inesperadamente, la concentración de MDA fue significativamente menor en el grupo de las ratas obesas a las seis horas de la inducción. Una posible explicación a este descenso puede ser la formación de aductos entre MDA y proteínas, o bien la absorción de los lípidos oxidados por leucocitos activados. Es interesante destacar que el MDA puede formar aductos con la hemoglobina, cuya concentración está aumentada en plasma tras la inducción de la PA, como hemos observado en el anterior estudio de la presente tesis (Cipierre y cols., 2013). Los niveles del 15-isoprostano F_{2t} aumentaron en ambos grupos tras la inducción de la

pancreatitis aguda, alcanzando los valores más altos en las ratas obesas que habían sufrido pancreatitis. Analizando la ascitis de las ratas control y obesas, se observó un incremento en ambos marcadores de peroxidación lipídica en el grupo de las ratas obesas.

Estos resultados indican un estrés oxidativo sistémico más intenso asociado a la pancreatitis en las ratas obesas. Los peróxidos lipídicos plasmáticos están asociados con activación de NF- κ B y la estimulación de la expresión de ICAM-1 en células endoteliales, induciendo disfunción de las células endoteliales y adhesión de los leucocitos (Takacs y cols., 2001). Consecuentemente, el incremento de la peroxidación lipídica puede contribuir a amplificar la respuesta inflamatoria en los animales obesos.

Como hemos mencionado en el anterior estudio, los isoprostanos pueden activar los receptores de los tromboxanos causando una potente vasoconstricción renal y pulmonar (Takahashi y cols., 1992, Delannoy y cols., 2010). Es importante resaltar que, tanto el pulmón como el riñón son los órganos extrapancreáticos más afectados en la pancreatitis aguda. Los niveles altos de isoprostanos están considerados como factor de riesgo independiente en la enfermedad coronaria del corazón (Davies y Roberts, 2011). En consecuencia, los isoprostanos pueden estar relacionados con la fisiopatología de la pancreatitis aguda en sujetos obesos, ya que concentraciones elevadas de isoprostanos pueden agravar la pancreatitis, enfermedad asociada con profundos cambios en parámetros hemodinámicos (Zhang y cols., 2008).

3.2. Necrosis grasa asociada a la pancreatitis aguda y obesidad.

La necrosis grasa aparece durante la pancreatitis en la grasa peripancreática, mesentérica y retroperitoneal, y es considerada consecuencia de la liberación de lipasa y fosfolipasa del páncreas en la cavidad peritoneal (Lee y cols., 1979; Ellis y cols., 2009). En este estudio, hemos visto que las áreas de necrosis grasa asociada a pancreatitis son mucho más abundantes en ratas obesas que en control. Por tanto, en los animales obesos, la necrosis grasa debe contribuir a una respuesta inflamatoria sistémica más intensa. Nuestros resultados también señalan que la lipasa posee una gran capacidad para unirse al tejido adiposo blanco en la pancreatitis, especialmente en estas áreas de necrosis, sugiriendo que la lipasa juega un papel activo en la generación de la necrosis grasa, particularmente en los animales obesos.

Otra consecuencia de la elevada actividad de la lipasa en el líquido ascítico es la alta concentración de ácidos grasos libres en este fluido (Pappas y cols., 1981), lo que puede explicar el aumento de los mismos en el plasma

una vez se ha inducido la pancreatitis. En este trabajo también hemos encontrado un llamativo aumento de estos ácidos grasos libres en la ascitis de las obesas en comparación con las no obesas. Los ácidos grasos libres pueden activar la apoptosis de las células endoteliales, cardiomiocitos y células β pancreáticas, siendo a altas concentraciones citotóxicos (de Vries y cols., 1997; Cnop y cols., 2001; Artwohl y cols., 2004). La alta concentración de ácidos grasos libres en la ascitis de los animales obesos puede afectar la permeabilidad de la barrera intestinal favoreciendo la traslocación bacteriana. Aunque la eliminación del líquido ascítico fuera beneficiosa respecto a la supervivencia en la pancreatitis aguda experimental (Niederau y cols., 1988), el lavado peritoneal no reduce la mortalidad o morbilidad en los ensayos clínicos desarrollados en pacientes no obesos (Platell y cols., 2001). Aun así, el lavado peritoneal podría ser considerado en el tratamiento de sujetos obesos.

También hemos observado que los niveles de triglicéridos plasmáticos son mucho más altos en las ratas obesas que en los animales control, tanto en condiciones basales como durante la pancreatitis. La hipertrigliceridemia es uno de los factores de riesgo más importantes de pancreatitis aguda (Toskes, 1990). También existe relación entre pacientes con hipertrigliceridemia severa, causada por mutaciones en la lipoproteinlipasa o en la apolipoproteína CII, y el desarrollo de pancreatitis recurrente (Wang y cols., 2009). De acuerdo con esta hipótesis, los ratones deficientes en lipoprotein lipasa muestran hipertrigliceridemia y una susceptibilidad elevada a sufrir pancreatitis aguda (Wang y cols., 2009). Por tanto, los niveles elevados de triglicéridos pueden contribuir también a aumentar la severidad de la pancreatitis aguda en los animales obesos.

4. EL LAVADO PERITONEAL MEJORA LAS COMPLICACIONES SISTÉMICAS EN RATAS OBESAS CON PANCREATITIS AGUDA.

En el desarrollo de la pancreatitis aguda severa, la formación de un exudado peritoneal rico en actividad enzimática lipolítica y proteolítica, sustancias vasoactivas y numerosos mediadores pro-inflamatorios es una de las diferentes complicaciones locales que pueden aparecer (Dugernier y cols., 2000). La composición y propiedades de este exudado o líquido ascítico parecen estar implicadas en la severidad de la enfermedad a nivel sistémico (Ramudo y cols., 2005; Gutiérrez y cols., 2008). El lavado del líquido ascítico con fines quirúrgicos para evitar su toxicidad se remonta a los años 60 y fue llevado a cabo por Wall en pacientes con fallo renal asociado a pancreatitis (Wall, 1965). Posteriormente, Ranson y Spencer observaron una mejoría notable en la fisiología respiratoria y cardiovascular con los lavados peritoneales iniciados dentro de las 48 horas del inicio de la enfermedad y realizados durante 2 a 4 días. Esta mejoría se tradujo en una reducción de la mortalidad temprana, relacionada con el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), pero no con la mortalidad tardía, asociada a las complicaciones sépticas (Ranson y Spencer, 1978). Otros estudios coincidían en el beneficio de la técnica si el procedimiento se iniciaba precozmente y se lograba una disminución del dolor abdominal, mejoría de la fisiología respiratoria, elevación de la calcemia, estabilización del hematocrito o corrección del medio interno (Buggy y Nostrant, 1983; Kauste y cols., 1983; Lasson y cols., 1984)

Sin embargo, en el primer ensayo clínico, multicéntrico y randomizado sobre el efecto del lavado peritoneal en la evolución de la pancreatitis aguda no se corroboraron estos resultados beneficiosos. En el estudio no se observaron diferencias en las complicaciones locales, niveles séricos de amilasa y/o mortalidad de los diferentes pacientes (Mayer y cols., 1985). Años más tarde, los resultados de este ensayo clínico sobre los índices de morbilidad y mortalidad se confirmaron en un nuevo meta-análisis (Platell y cols., 2001). No obstante, diversos autores continuaron defendiendo la realización del lavado de la cavidad peritoneal en fases tempranas de la enfermedad y en los casos de pancreatitis aguda infecciosa (De Waele y cols., 2000; Caronna y cols., 2009).

El lavado peritoneal en la pancreatitis aguda experimental suele mostrar una mejoría en la evolución de la enfermedad y una reducción en la mortalidad de los animales (Van Hee y cols., 1981; Satake y cols., 1985; Fric y cols., 1992; Souza y cols., 2010; Meng y cols., 2013), pero igual que sucede en la práctica

clínica, también hay resultados contradictorios sobre su utilización (Folch y cols., 2000b).

En la presente Tesis, se han realizado dos estudios demostrando la contribución del líquido ascítico en la fisiopatología de las complicaciones sistémicas de la pancreatitis aguda necrótica experimental. En el primer estudio, se ha puesto de manifiesto la participación de la hemoglobina extracelular en el desarrollo de la pancreatitis aguda severa, además de su origen en la capacidad hemolítica del líquido ascítico. En el siguiente, se ha constatado la participación de la lipasa pancreática, existente en la ascitis, en la formación de necrosis grasa, y también, en la posible generación de lípidos oxidados y ácidos grasos libres que puedan intervenir en el peor pronóstico de los animales obesos. En base a estos dos estudios, el siguiente objetivo de la Tesis consistió en la realización del lavado peritoneal para intentar evitar los efectos locales y sistémicos del líquido ascítico, centrándonos fundamentalmente en la posible influencia que podría tener este fluido en la evolución de la pancreatitis aguda en sujetos obesos.

4.1. Efecto del lavado peritoneal sobre las complicaciones locales de la pancreatitis aguda y en la obesidad.

Previo al estudio de la influencia del lavado peritoneal sobre el tejido pancreático, se determinaron los niveles de lipasa pancreática en plasma, parámetro utilizado en el diagnóstico de la pancreatitis aguda (Al-Bahrani y cols., 2005). Nuestros resultados coincidieron con los obtenidos por otros autores (Fric y cols., 1992; Folch y cols., 2000b). En las ratas *lean* y en las ratas obesas se produjo una disminución de los niveles de lipasa pancreática en plasma tras aplicación del lavado, sin diferencias entre ambos grupos, indicando que la presencia de la enzima lipolítica en sangre puede estar relacionada con la reabsorción peritoneal desde el líquido ascítico. En clínica no es habitual emplear el valor de lipasa pancreática en plasma como indicador de severidad de la pancreatitis aguda (Yadav y cols., 2002). Sin embargo, recientemente se ha comprobado que los niveles en suero de lipasa pueden utilizarse como predictores de gravedad en la pancreatitis aguda pediátrica (Coffey y cols., 2013) o como parámetro de daño pancreático en ciertas patologías pancreáticas de origen traumático (Herman y cols., 2011).

Los niveles de GSH basales y los obtenidos tras la inducción de la pancreatitis aguda en páncreas confirmaron los resultados hallados en el anterior estudio. Las ratas obesas presentan menor concentración de GSH en el tejido pancreático, responsable posiblemente de un mayor daño oxidativo en el tejido de las ratas obesas tras la inducción de la enfermedad. El drenaje del

líquido ascítico no previene la depleción de GSH en ninguno de los grupos experimentales.

Junto al GSH, también se estudió en páncreas la expresión de dos genes relacionados con la inflamación e indicativos por tanto del daño tisular, *inos* y *ho-1*. La activación de la HO-1 está relacionada con el estado de inflamación crónico característico de la obesidad. Los niveles proteicos de HO-1 están sobreexpresados en el tejido adiposo de ratas alimentadas con dieta grasa (Park y cols. 2012) y en la arteria aorta de ratas obesas Zucker, participando en el remodelado del tejido adiposo (Nicolai y cols., 2009). Su función está regulada por la hormona adiponectina, liberada por los adipocitos hipertrofiados para disminuir el estado pro-inflamatorio de la obesidad. Sin embargo, se ha publicado recientemente que su sobreexpresión no protege contra la obesidad (Huang y cols., 2013). Nuestros resultados mostraron la sobreexpresión de *ho-1* en el páncreas de las ratas obesas en condiciones basales. La inducción de la pancreatitis aguda aumentó considerablemente los niveles de expresión génica de *ho-1* en ambos grupos, sin diferencias entre ellos, indicando que el daño tisular originado por la perfusión de taurocolato es igual en el páncreas de las ratas control que en el de las ratas obesas. Por el contrario, otros autores defienden que el aumento de los niveles de HO-1 mediante tratamiento farmacológico está relacionado con la protección del tejido y se asocia con una mejoría en la evolución de la enfermedad (Nuhn y cols., 2013). Habtezion, utilizando otro modelo experimental de pancreatitis aguda, como el obtenido mediante dieta deficiente en colina y suplementada con etionina, observó que los ratones no experimentaron un aumento de la expresión de HO-1 en páncreas tras la inducción de la enfermedad. Para conseguir el aumento de expresión, con fines terapéuticos, emplearon la inyección intravenosa de panhematina, capaz de conseguir el reclutamiento de macrófagos (Habtezion y cols., 2011). En nuestro modelo, pensamos que la sobreexpresión de *ho-1* está relacionada con el daño del tejido. Para ello, se determinaron los niveles relativos de ARNm de otra enzima implicada en los diferentes procesos inflamatorios que acontecen en el páncreas durante la pancreatitis aguda, la *inos* (Cuzzocrea y cols., 2002; Sung y cols., 2013). Altos niveles de expresión de *inos* en páncreas están relacionados con la severidad de la enfermedad, asociándose su disminución con un mejor pronóstico en la evolución (Jung y cols., 2010). En nuestro estudio, tras la inducción de la enfermedad, los niveles génicos de *inos* alcanzaron valores elevadísimos en el páncreas de ratas control y obesas, experimentando un perfil similar al de la *ho-1*, y por tanto, demostrando que la sobreexpresión de esta última también puede emplearse como marcador de daño inflamatorio del tejido pancreático. El lavado peritoneal no modificó los valores de expresión de *ho-1* e *inos* causados por la pancreatitis aguda en ninguno de los grupos experimentales.

Los resultados obtenidos, tras la aplicación del lavado peritoneal, en el estudio del GSH y de la expresión de *ho-1* e *inos* en el páncreas indican que el drenaje del líquido ascítico no interviene en la evolución local de la pancreatitis aguda y como consecuencia, los posibles efectos beneficiosos del tratamiento sobre las complicaciones sistémicas no serán debidas a una disminución del daño causado sobre el tejido pancreático.

4.2. El lavado peritoneal disminuye las complicaciones sistémicas en ratas obesas con pancreatitis aguda.

En los estudios anteriores de la presente Tesis hemos podido comprobar el efecto que ejercen la hemoglobina extracelular y la lipasa pancreática del líquido ascítico sobre la formación de necrosis grasa en la pancreatitis aguda. Al realizar el lavado peritoneal, observamos la desaparición de estas áreas necróticas en el tejido adiposo abdominal (Tilquin y cols., 1990), indicando que su origen está relacionado con la presencia y composición del líquido ascítico tras la inducción de la pancreatitis aguda. Otros autores han descrito previamente que la necrosis grasa puede contribuir a la respuesta sistémica de la enfermedad mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y la activación de macrófagos peritoneales (Franco-Pons y cols., 2010). Por tanto, la ausencia de necrosis grasa en el tejido adiposo abdominal puede ayudar a obtener un mejor pronóstico en el desarrollo de la enfermedad. Debemos destacar que el número de focos de necrosis grasa tras la pancreatitis es considerablemente mayor en las ratas obesas que en las ratas control, sugiriendo que el lavado peritoneal podría resultar más beneficioso en el caso de sujetos obesos.

Continuando con el tejido adiposo abdominal, se estudió la expresión de genes relacionados con la inflamación y su posible relación con la disminución de áreas de necrosis grasa observada tras la realización del lavado peritoneal. En primer lugar, destacar la sobreexpresión en el tejido adiposo de las ratas obesas de los genes *ho-1*, *inos*, *tnf- α* , *il-1 β* e *il-6* en condiciones basales, evidenciando el estado de inflamación crónica asociado a la obesidad (Medzhitov, 2008; Redinger, 2008; Park y cols. 2012). Como era de esperar, la pancreatitis aumentó la expresión de estos genes en el tejido adiposo abdominal (Gea-Sorlí y cols., 2012), sólo observando diferencias entre las ratas control y las ratas obesas en el caso del *tnf- α* , siendo la expresión de esta citoquina más elevada en el grupo de animales obesos. La retirada del líquido ascítico provocó la disminución de expresión de estos genes en el tejido adiposo tras la inducción de la pancreatitis. Destacar en este punto que los niveles de ARNm de *tnf- α* y de *il-1 β* hallados tras la aplicación del lavado peritoneal fueron los mismos que los obtenidos en condiciones basales,

estando estas citoquinas implicadas en procesos de muerte celular por necrosis (Saldeen y cols., 2000; Fortes y cols., 2012; Chu, 2013).

En base a estos resultados, podemos sugerir que la retirada del líquido ascítico tras la inducción de la pancreatitis aguda desempeña un papel protector sobre el daño inflamatorio que sufre el tejido adiposo abdominal durante la evolución de la enfermedad, tanto en ratas control como en ratas obesas. Este efecto protector puede deberse, al menos en parte, a la eliminación de la hemoglobina extracelular presente en el líquido ascítico y como consecuencia, a la desaparición de las propiedades proinflamatorias del grupo hemino anteriormente descritas (Figueiredo y cols., 2007; Simões y cols., 2013). Además, la realización del lavado reduciría la necrosis en los macrófagos peritoneales a través de vías dependientes de TLR4 mediante TNF- α (Fortes y cols., 2012) y también la acción lipolítica de la lipasa pancreática sobre los adipocitos (Lee y cols., 1979; Ellis y cols., 2009), dando una posible explicación a la desaparición de las áreas de necrosis grasa características de la pancreatitis aguda experimental inducida por taurocolato sódico.

A continuación, nos planteamos estudiar la expresión génica de *ho-1* y de *inos* en el hígado, debido a que su sobreexpresión en el tejido hepático es característica en la sepsis (Eum y cols., 2007), patología con un desarrollo sistémico similar a la pancreatitis aguda (Nystrom, 1998). En condiciones basales, los niveles de ARNm de estas dos enzimas fueron más elevados en el hígado de las ratas obesas (Shinozaki y cols., 2011; Park y cols., 2012). A las seis horas de la inducción de la pancreatitis aguda, la expresión génica de *ho-1* y de *inos* aumentó considerablemente en ambos grupos, obteniendo valores relativos de expresión génica mayores en el grupo de las obesas. Este resultado indicaría una mayor afectación del tejido hepático en el transcurso de la pancreatitis aguda en sujetos obesos, coincidiendo con los estudios publicados por otros autores (Segersvärd y cols., 2008; Frossard y cols., 2009). La retirada de la ascitis en la cavidad peritoneal produjo una disminución muy marcada de la expresión génica de *ho-1* y de *inos* en el hígado de ratas obesas, sugiriendo un efecto beneficioso del lavado peritoneal en sujetos obesos y como consecuencia, una mejor respuesta sistémica durante la evolución de la pancreatitis aguda.

Por último, se estudió el efecto que podría ejercer el lavado peritoneal sobre el territorio pulmonar en el contexto de la pancreatitis aguda y la obesidad. Anteriormente, analizamos la contribución de la hemoglobina extracelular en la afectación pulmonar asociada a pancreatitis a través de la activación del factor inducible por hipoxia (HIF) (Jiang y cols., 2012; Lisk y cols., 2013). De nuevo, al realizar la inducción de la pancreatitis observamos el

resultado esperado, aumento de la expresión de los genes estudiados dependientes de la vía de HIF, *inos*, *vegfa*, *enos* y *hexoquinasa-2*, sin obtener diferencias entre ratas control y ratas obesas. La retirada del líquido ascítico se tradujo en una disminución de la expresión de estos genes en el tejido pulmonar de ambos grupos experimentales, indicando que la activación de esta vía está regulada por la reabsorción a nivel peritoneal de moléculas procedentes del líquido ascítico, destacando entre éstas la hemoglobina extracelular liberada por hemólisis, como observamos en el trabajo anterior (Lisk y cols., 2013).

El análisis de la infiltración leucocitaria en el pulmón mediante la actividad mieloperoxidasa (MPO) deparó diferencias entre las ratas control y las ratas obesas. En primer lugar, observamos que la MPO pulmonar alcanzó valores más elevados en las ratas obesas tanto en condiciones basales (Kaplan y cols., 2012) como tras la inducción de la pancreatitis (Zyromski y cols., 2008), indicando una mayor afectación del tejido pulmonar en sujetos obesos en ambas situaciones. La aplicación del lavado peritoneal provocó un descenso de la MPO pulmonar sólo en el grupo de las ratas obesas, obteniendo unos valores cercanos a los hallados en condiciones basales, y por tanto, reduciendo considerablemente la afectación pulmonar asociada a la pancreatitis aguda severa. Esta disminución de la infiltración leucocitaria en el pulmón de las ratas obesas puede deberse, al menos en parte, al descenso en la expresión pulmonar de un factor quimiotáctico como VEGFA (Barleon y cols., 1996). Destacar que este descenso en la expresión génica de *vegfa* también se ha observado en el pulmón de las ratas control, no estando acompañado el descenso con una disminución de la MPO en este caso. Este resultado sugiere que hay más factores involucrados en la infiltración leucocitaria pulmonar, posiblemente relacionados con el propio líquido ascítico (Fujita y cols., 2001) y con las numerosas áreas de necrosis grasa observadas tras la inducción de la pancreatitis aguda en ratas obesas. Hemos mencionado anteriormente que estas lesiones del tejido adiposo están relacionadas con las complicaciones sistémicas de la enfermedad debido a su capacidad para liberar distintos mediadores inflamatorios (Franco-Pons y cols., 2010; 2013), y por tanto, la desaparición de estas áreas de necrosis, tras la realización del lavado, puede contribuir al descenso del infiltrado leucocitario pulmonar observado fundamentalmente en las ratas obesas.

En conclusión, la utilización del lavado peritoneal contribuye a una mejor evolución de la pancreatitis aguda necrótica experimental. El drenaje del líquido ascítico ejerce un efecto protector sobre el tejido adiposo abdominal, traducido en la desaparición de las áreas de necrosis grasa, especialmente numerosas en las ratas obesas, y como consecuencia, en una menor respuesta inflamatoria sistémica mediada por estas áreas. A nivel pulmonar, produce una

disminución en la expresión de genes relacionados con la permeabilidad vascular potencialmente responsables del edema de pulmón asociado a pancreatitis; y un descenso de la infiltración leucocitaria en el grupo de ratas obesas. Por tanto, atendiendo a nuestros resultados, el lavado peritoneal podría considerarse en el tratamiento de la pancreatitis aguda en sus fases tempranas, en pacientes obesos, evitando de esta forma la respuesta sistémica del tejido adiposo y del líquido ascítico, así como las posibles complicaciones pulmonares derivadas del mismo en el desarrollo de la pancreatitis aguda.

VI-CONCLUSIONES

En el estudio del papel del estrés oxidativo y del tejido adiposo abdominal en la respuesta local y sistémica de la pancreatitis aguda experimental, se han obtenido las siguientes conclusiones:

- 1.- En la pancreatitis aguda necrótica inducida por taurocolato sódico en ratas *Wistar* se detecta la presencia de hemoglobina extracelular y su actividad peroxidasa asociada en el líquido ascítico y en el plasma, aumentando sus niveles de forma intensa en fases tempranas de la patología.
- 2.- La hemoglobina extracelular detectada en la ascitis y en el plasma de ratas *Wistar* con pancreatitis aguda tiene su origen en la actividad hemolítica del líquido ascítico.
- 3.- La hemoglobina extracelular contribuye a la respuesta local y sistémica de la pancreatitis aguda a través del incremento de la ascitis, de la producción de necrosis grasa, y por la inducción de citoquinas pro-inflamatorias en el tejido adiposo abdominal y de la vía de HIF-1 α /VEGF en el pulmón.
- 4.- La pancreatitis aguda necrótica en ratas obesas se asocia con una depleción y oxidación de glutatión en páncreas y con un aumento de la peroxidación lipídica en líquido ascítico y plasma respecto a las ratas control que podrían contribuir al peor pronóstico de la enfermedad en obesidad.
- 5.- El lavado peritoneal del líquido ascítico ejerce un efecto protector tanto en el tejido adiposo abdominal, provocando la desaparición de las áreas de necrosis grasa, como a nivel pulmonar, disminuyendo la infiltración leucocitaria y la expresión de genes relacionados con el edema pulmonar asociado a la pancreatitis aguda.

VII-BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Zidan, F. M., M. J. Bonham and J. A. Windsor (2000). "Severity of acute pancreatitis: a multivariate analysis of oxidative stress markers and modified Glasgow criteria." *Br J Surg* 87(8): 1019-23.
- Acioli, J. M., M. Isobe and S. Kawasaki (1997). "Early complement system activation and neutrophil priming in acute pancreatitis: participation of trypsin." *Surgery* 122(5): 909-17.
- Afonina, I. S., G. A. Tynan, S. E. Logue, S. P. Cullen, M. Bots, A. U. Lüthi, E. P. Reeves, N. G. McElvaney, J. P. Medema, E. C. Lavelle and S. J. Martin (2011). "Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1 α ." *Mol Cell* 44(2): 265-78.
- Aho, H. J., S. M. Koskensalo and T. J. Nevalainen (1980). "Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis." *Scand J Gastroenterol* 15(4): 411-6.
- Aho, H. J., T. J. Nevalainen and A. J. Aho (1983). "Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection." *Eur Surg Res* 15(1): 28-36.
- Alayash, A. I., B. A. Ryan, R. F. Eich, J. S. Olson and R. E. Cashon (1999). "Reactions of sperm whale myoglobin with hydrogen peroxide. Effects of distal pocket mutations on the formation and stability of the ferryl intermediate." *J Biol Chem* 274(4): 2029-37.
- Alayash, A. I. (2004). "Redox biology of blood." *Antioxid Redox Signal* 6(6): 941-3.
- Al-Bahrani, A. Z. and B. J. Ammori (2005). "Clinical laboratory assessment of acute pancreatitis." *Clin Chim Acta* 362(1-2): 26-48.
- Alberti, K. G. and P. Z. Zimmet (1998). "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation." *Diabet Med* 15(7): 539-53.
- Algül, H., Y. Tando, M. Beil, C. K. Weber, C. Von Weyhern, G. Schneider, G. Adler, R. M. Schmid (2002). "Different modes of NF-kappaB/Rel activation in pancreatic lobules." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(2): G270-81.
- Alsfasser, G., M. Gock, L. Herzog, M. M. Gebhard, C. Herfarth, E. Klar and J. Schmidt (2002). "Glutathione depletion with L-buthionine-(S,R)-sulfoximine demonstrates deleterious effects in acute pancreatitis of the rat." *Dig Dis Sci* 47(8): 1793-99.
- Altavilla, D., C. Famulari, M. Passaniti, M. Galeano, A. Macrì, P. Seminara, L. Minutoli, H. Marini, M. Calò, F. S. Venuti, M. Esposito and F. Squadrito (2003). "Attenuated cerulein-induced pancreatitis in nuclear factor-kappaB-deficient mice." *Lab Invest* 83(12): 1723-32.
- Ambeba, E. and F. Linkov (2011). "Advancements in the use of blood tests for cancer screening in women at high risk for endometrial and breast cancer." *Future Oncol* 7(12): 1399-414.
- Ammann, R. W., S. Raimondi, P. Maisonneuve and B. Mullhaupt; Zurich Pancreatitis Study Group (2010). "Is obesity an additional risk factor for alcoholic chronic pancreatitis?" *Pancreatology* 10(1): 47-53.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga and T. M. Hagen (1993). "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 7915-7922.
- Andersson, B., D. Ansari, E. Andersson, S. Persson and R. Andersson (2010). "Fatal acute pancreatitis occurring outside of the hospital: clinical and social characteristics." *World J Surg* 34(10): 2286-91.
- Ang, A. D., S. Adhikari, S. W. Ng and M. Bhatia (2009). "Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitric oxide production in acute pancreatitis and associated lung injury." *Pancreatology* 9(1-2): 150-9.

- Aparisi, L. and F. Raga (1991). "Epidemiología de la pancreatitis aguda." *Gastroenterol Hepatol* 14: 161-170.
- Appel, L. J., T. J. Moore, E. Obarzanek, W. M. Vollmer, L. P. Svetkey, F. M. Sacks, G. A. Bray, T. M. Vogt, J. A. Cutler, M. M. Windhauser, P. H. Lin and N. Karanja (1997). "A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group." *N Engl J Med* 336(16): 1117-24.
- Araki, H., T. Nishihara, M. Matsuda, A. Fukuhara, S. Kihara, T. Funahashi, T. R. Kataoka, Y. Kamada, T. Kiyohara, S. Tamura, N. Hayashi and I. Shimomura (2008). "Adiponectin plays a protective role in caerulein-induced acute pancreatitis in mice fed a high-fat diet." *Gut* 57(10): 1431-40.
- Arena, S., S. Benvenuti and A. Bardelli (2005). "Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer." *Cell Mo. Life Sci* 62: 2092-99.
- Artwohl, M., M. Roden, W. Waldhausl, A. Freudenthaler and S.M. Baumgartner-Parzer (2004). "Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells." *FASEB J* 18: 146-48.
- Austin, J. L., C. Roberts, M. J. Rosenholtz and H. A. Reber (1980). "Effects of partial duct obstruction and drainage of pancreatic function." *J Surg Res* 28(5): 426-33.
- Austin, S. and J. St-Pierre (2012). "PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders." *J Cell Sci* 125(Pt 21): 4963-71.
- Badr, K. F. and T. E. Abi-Antoun (2005). "Isoprostanes and the kidney." *Antioxid Redox Signal* 7(1-2): 236-43.
- Baeuerle, P. A. and T. Henkel (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." *Annu Rev Immunol* 12: 141-79.
- Bakker, O. J., H. van Santvoort, M. G. Besselink, M. A. Boermeester, C. van Eijck, K. Dejong, H. van Goor, S. Hofker, U. Ahmed Ali, H. G. Gooszen and T. L. Bollen; for the Dutch Pancreatitis Study Group (2012). "Extrapancreatic necrosis without pancreatic parenchymal necrosis: a separate entity in necrotising pancreatitis?" *Gut*.
- Baggaley, E. M., A. C. Elliott and J. I. Bruce (2008). "Oxidant-induced inhibition of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in pancreatic acinar cells: role of the mitochondria". *Am J Physiol Cell Physiol* 295: 1247-60.
- Balthazar, E. J., D. L. Robinson, A. J. Megibow and J. H. Ranson (1990). "Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis." *Radiology* 174(2): 331-6.
- Banks, P. A., T. L. Bollen, C. Dervenis, H. G. Gooszen, C. D. Johnson, M. G. Sarr, G. G. Tsiotos and S. S. Vege (2013) "Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus." *Gut* 62(1): 102-11.
- Bannai, S. (1984). "Transport of cystine and cysteine in mammalian cells." *Biochim Biophys Acta* 779(3): 289-306.
- Bannai, S., T. Ishii, A. Takada and T. Noriko (1989). Regulation of glutathione level by amino acid transport. *Glutathione centennial*. N. Taniguchi, T. Higashi, Y. Sakamoto and A. Meister. San Diego, Academic Press: 407-421.
- Bardou, M., A. N. Barkun and M. Martel (2013). "Obesity and colorectal cancer." *Gut* 62(6): 933-47.
- Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H. A. Weich, A. Mantovani D. Marmé (1996). "Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1." *Blood* 87(8): 3336-43.
- Baron, T. H., W. G. Thaggard, D. E. Morgan and R. J. Stanley (1996). "Endoscopic therapy for organized pancreatic necrosis." *Gastroenterology* 111(3): 755-64.

- Baumann, B., M. Wagner, T. Aleksic, G. von Wichert, C. K. Weber, G. Adler and T. Wirth (2007). "Constitutive IKK2 activation in acinar cells is sufficient to induce pancreatitis in vivo." *J Clin Invest* 117(6): 1502-13.
- Beauchamp, M. H., A. K. Martinez-Bermudez, F. Gobeil, A. M. Marrache, X. Hou, G. Speranza, D. Abran, C. Quiniou, P. Lachapelle and L. J. Roberts II (2001). "Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy." *J Appl Physiol* 90: 2279-99
- Beger, H. G., R. Bittner, M. Buchler, W. Hess and J. E. Schmitz (1986). "Hemodynamic data pattern in patients with acute pancreatitis." *Gastroenterology* 90(1): 74-9.
- Behrens, G. and M. F. Leitzmann (2013). "The association between physical activity and renal cancer: systematic review and meta-analysis." *Br J Cancer* 108(4): 798-811.
- Bencini, A., P. Failli, B. Valtancoli and D. Bani (2010). "Low molecular weight compounds with transition metals as free radical scavengers and novel therapeutic agents." *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 8(3):128-46.
- Benndorf, R. A., E. Schwedhelm, A. Gnann, R. Taheri, G. Kom, M. Didié, A. Steenpass, S. Ergün S and R. H. Böger (2008). "Isoprostanes inhibit vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration, tube formation, and cardiac vessel sprouting in vitro, as well as angiogenesis in vivo via activation of the thromboxane A(2) receptor: a potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis." *Circ Res* 103(9): 1037-46.
- Bhatia, M., A. K. Saluja, B. Hofbauer, H. S. Lee, J. L. Frossard and M. L. Steer (1998). "The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasive model of acute pancreatitis-associated lung injury." *Int J Pancreatol* 24(2): 77-83.
- Bhatia, M. and S. Moochhala (2004). "Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome." *J Pathol* 202(2): 145-56.
- Bhoomagoud, M., T. Jung, J. Atladottir, T. R. Kolodecik, C. Shugrue, A. Chaudhuri, E. C. Thrower and F. S. Gorelick (2009). "Reducing extracellular pH sensitizes the acinar cell to secretagogue-induced pancreatitis responses in rats." *Gastroenterology* 137(3): 1083-92.
- Bleich, S., D. Cutler, C. Murray and A. Adams (2007). "Why is the Developed World Obese?" *National Bureau of Economic Research Working Paper No. 12954*.
- Bollen, T.L., V. K. Singh, R. Maurer, K. Repas, H. W. van Es, P. A. Banks and K. J. Mortele (2012). "A comparative evaluation of radiologic and clinical scoring systems in the early prediction of severity in acute pancreatitis." *Am J Gastroenterol* 107(4): 612-9.
- Booth, D. M., J. A. Murphy, R. Mukherjee, M. Awais, J. P. Neoptolemos, O. V. Gerasimenko, A. V. Tepikin, O. H. Petersen, R. Sutton and D.N. Criddle (2011). "Reactive Oxygen Species Induced by Bile Acid Induce Apoptosis and Protect Against Necrosis in Pancreatic Acinar Cells." *Gastroenterology* 140: 2116-25.
- Bradley, E. L., 3rd, F. Murphy and C. Ferguson (1989). "Prediction of pancreatic necrosis by dynamic pancreatography." *Ann Surg* 210(4): 495-503; discussion 503-4.
- Bradley, E. L., 3rd (1993). "A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992." *Arch Surg* 128(5): 586-90.
- Brantley, M. A. Jr, M. P. Osborn, B. J. Sanders, K. A. Rezaei, P. Lu, C. Li, G. L. Milne, J. Cai and P. Jr Sternberg (2012). "Plasma biomarkers of oxidative stress and genetic variants in age-related macular degeneration." *Am J Ophthalmol* 153(3): 460-467.
- Brigelius, R., C. Muckel, T. P. M. Akerbom and H. Sies (1983). "Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide." *Biochem Pharmacol* 32: 2529-2534.
- Browne, G. W. and C. S. Pitchumoni (2006). "Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis." *World J Gastroenterol* 12(44): 7087-96.

- Büchler, M., P. Malfertheiner, W. Uhl, J. Scholmerich, F. Stockmann, G. Adler, W. Gaus, K. Rolle and H. G. Beger (1993). "Gabexate mesilate in human acute pancreatitis. German Pancreatitis Study Group." *Gastroenterology* 104(4): 1165-70.
- Buehler, P. W. and F. D'Agnillo (2010a). "Toxicological consequences of extracellular hemoglobin: biochemical and physiological perspectives." *Antioxid Redox Signal* 12(2): 275-91.
- Buehler, P. W., F. D'Agnillo and D. J. Schaer (2010b). "Hemoglobin-based oxygen carriers: From mechanisms of toxicity and clearance to rational drug design." *Trends Mol Med* 16(10): 447-57.
- Buehler, P. W., J. H. Baek, C. Lisk, I. Connor, T. Sullivan, D. Kominsky, S. Majka, K. R. Stenmark, E. Nozik-Grayck, J. Bonaventura and D. C. Irwin (2012). "Free hemoglobin induction of pulmonary vascular disease: evidence for an inflammatory mechanism." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303(4): L312-26.
- Buggy, B. P. and T. T. Nostrant (1983). "Lethal pancreatitis." *Am J Gastroenterol* 78(12): 810-4.
- Bulua, A. C., A. Simon, R. Maddipati, M. Pelletier, H. Park, K. Y. Kim, M. N. Sack, D. L. Kastner and R. M. Siegel (2011). "Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS)." *J Exp Med* 208(3): 519-33.
- Burke, T. R. and Z. Y. Zhang (1998). "Protein-tyrosine phosphatases: Structure, mechanism, and inhibitor discovery." *Biopolymers* 47: 225-41.
- Calcerrada, P., G. Peluffo and R. Radi (2011). "Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications." *Curr Pharm Des* 17(35): 3905-32.
- Camps, M., A. Nichols and S. Arkininstall (2000). "Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function." *FASEB J* 14: 6-16.
- Carnovale, A., P. G. Rabitti, G. Manes, P. Esposito, L. Pacelli and G. Uomo (2005). "Mortality in acute pancreatitis: is it an early or a late event?" *JOP* 6(5): 438-44.
- Caronna, R., M. Benedetti, A. Morelli, M. Rocco, L. Diana, G. Prezioso, M. Cardi, M. Schiratti, G. Martino, G. Fanello, F. Papini, F. Farelli, R. L. Meniconi, M. Marengo, G. Dinatale and P. Chirletti (2009). "Clinical effects of laparotomy with perioperative continuous peritoneal lavage and postoperative hemofiltration in patients with severe acute pancreatitis." *World J Emerg Surg* 16; 4:45.
- Chan, Y. C. and P. S. Leung (2007). "Angiotensin II type 1 receptor-dependent nuclear factor-kappaB activation-mediated proinflammatory actions in a rat model of obstructive acute pancreatitis." *J Pharmacol Exp Ther* 323(1): 10-8.
- Chance, B., H. Sies and A. Boveris (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." *Physiol Rev* 59(3): 527-605.
- Cheeseman, K. H. and T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." *Br. Med. Bull.* 49(3): 588-603.
- Chen, S. M., G. S. Xiong and S. M. Wu (2012). "Is obesity an indicator of complications and mortality in acute pancreatitis? An updated meta-analysis." *J Dig Dis* 13(5): 244-51.
- Cheng, S., W. M. Yan, B. Yang, J. D. Shi, M. M. Song and Y. Zhao (2010). "A crucial role of nitric oxide in acute lung injury secondary to the acute necrotizing pancreatitis." *Hum Exp Toxicol* 29(4): 329-37.
- Chiari, H. (1896). "Über selbstverdauung des Menschlichen Pancreas." *Zeitschrift für Heilkunde* 17: 69-96.
- Chiarugi, P. (2005). "PTPs versus PTKs: the redox side of the coin." *Free Radic Res* 39: 353-64.

- Choi, A. M., S. W. Ryter and B. Levine (2013). "Autophagy in human health and disease." *N Engl J Med* 368(7): 651-62.
- Chu, W. M. (2013). "Tumor necrosis factor." *Cancer Lett* 328(2): 222-5.
- Cinti, S. (2006). "The role of brown adipose tissue in human obesity." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16(8): 569-74.
- Cipierre, C., S. Hayès, D. Maucort-Boulch, J. P. Steghens and J. C. Picaud (2013). "Malondialdehyde adduct to hemoglobin: a new marker of oxidative stress suitable for full-term and preterm neonates." *Oxid Med Cell Longev* 2013: 694014.
- Clavien, P. A., H. Hauser, P. Meyer and A. Rohner (1988). "Value of contrast-enhanced computerized tomography in the early diagnosis and prognosis of acute pancreatitis. A prospective study of 202 patients." *Am J Surg* 155(3): 457-66.
- Closa, D., J. Rosello-Catafau, G. Hotter, O. Bulbena, L. Fernandez-Cruz and E. Gelpi (1993). "Cyclooxygenase and lipoxygenase metabolism in sodium taurocholate induced acute hemorrhagic pancreatitis in rats." *Prostaglandins* 45(4): 315-22.
- Closa, D., O. Bulbena, G. Hotter, J. Rosello-Catafau, L. Fernandez-Cruz and E. Gelpi (1994). "Xanthine oxidase activation in cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in rats." *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 102(3): 167-70.
- Closa, D., M. Bardaji, G. Hotter, N. Prats, E. Gelpi, L. Fernandez-Cruz and J. Rosello-Catafau (1996). "Hepatic involvement in pancreatitis-induced lung damage." *Am J Physiol* 270(1 Pt 1): G6-13.
- Closa, D., L. Sabater, L. Fernández-Cruz, N. Prats, E. Gelpi and J. Roselló-Catafau (1999). "Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver." *Ann Surg* 229(2): 230-6.
- Cnop, M., J. C. Hannaert, A. Hoorens, D. L. Eizirika and D. G. Pipeleers (2001). "Inverse relationship between cytotoxicity of FFA in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation." *Diabetes* 50: 1771-77.
- Coffey, M. J., S. Nightingale and C. Y. Ooi (2013). "Serum lipase as an early predictor of severity in pediatric acute pancreatitis." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 56(6): 602-8.
- Commins, S., J. W. Steinke and L. Borish (2008). "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(5): 1108-11.
- Contassot, E., H. D. Beer and L. E. French (2012). "Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin." *Swiss Med Wkly* 142: w13590.
- Cracowski, J. L. (2004). "Isoprostanes: an emerging role in vascular physiology and disease?" *Chem Phys Lipids* 128(1-2): 75-83.
- Craig, K. and D. Dorscheid (2002). "Understanding the roles of the transcription factors nuclear factor-kappaB and hypoxia-inducible factor-1alpha in lung injury." *Crit Care* 6(6): 471-2.
- Criddle, D. N., J. V. Gerasimenko, H. K. Baumgartner, M. Jaffar, S. Voronina, R. Sutton, O. H. Petersen and O. V. Gerasimenko (2007). "Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis?" *Cell Death Differ* 14(7): 1285-94.
- Cuzzocrea, S., E. Mazzon, L. Dugo, I. Serraino, T. Centorrino, A. Ciccolo, F. A. Van de Loo, D. Britti, A. P. Caputi and C. Thiemermann (2002). "Inducible nitric oxide synthase-deficient mice exhibit resistance to the acute pancreatitis induced by cerulein." *Shock* 17(5): 416-22.
- Dabrowski, A., A. Gabryelewicz, U. Wereszczynska-Siemiakowska and L. Chyczewski (1988). "Oxygen-derived free radicals in cerulein-induced acute pancreatitis." *Scand J Gastroenterol* 23(10): 1245-9.

- D'Agnillo, F. and A. I. Alayash (2000). "Interactions of hemoglobin with hydrogen peroxide alters thiol levels and course of endothelial cell death." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279(4): H1880-9.
- D'Alessio, F. R., K. Tsushima, N. R. Aggarwal, J. R. Mock, Y. Eto, B. T. Garibaldi, D. C. Files, C. R. Avalos, J. V. Rodriguez, A. T. Waickman, S. P. Reddy, D. B. Pearse, V. K. Sidhaye, P. M. Hassoun, M. T. Crow and L. S. King (2012). "Resolution of experimental lung injury by monocyte-derived inducible nitric oxide synthase." *J Immunol* 189(5): 2234-45.
- D'Autréaux, B. and M. B. Toledano (2007). "ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10): 813-24.
- Davenport, R. D. and S. L. Kunkel (1994). "Cytokine roles in hemolytic and nonhemolytic transfusion reactions." *Transfus Med Rev* 8(3): 157-68.
- Davies, S.S. and L. J. 2nd Roberts (2011). "F2-isoprostanes as an indicator and risk factor for coronary heart disease." *Free Radic Biol Med* 50(5) :559-66.
- Dawra, R., R. P. Sah, V. Dudeja, L. Rishi, R. Talukdar, P. Garg and A. K. Saluja (2011). "Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis." *Gastroenterology* 141(6): 2210-2217.e2.
- De Castro, L. M., J. C. Jonassaint, F. L. Graham, A. Ashley-Kocha and M. J. Telen (2008). "Pulmonary hypertension associated with sickle cell disease: clinical and laboratory endpoints and disease outcomes." *Am J Hematol* 83(1): 19-25.
- de Dios, I., L. Ramudo, J. R. Alonso, J. S. Recio, A. C. Garcia-Montero M. A. Manso (2005). "CD45 expression on rat acinar cells: involvement in pro-inflammatory cytokine production." *FEBS Lett* 579(28): 6355-60.
- de Dios, I., L. Ramudo, A. C. Garcia-Montero and M. A. Manso (2006). "Redox-sensitive modulation of CD45 expression in pancreatic acinar cells during acute pancreatitis." *J Pathol* 210:234-9.
- de Madaria, E., J. Martínez, B. Lozano, L. Sempere, S. Benloch, J. Such, F. Uceda, R. Francés and M. Pérez-Mateo (2005). "Detection and identification of bacterial DNA in serum from patients with acute pancreatitis." *Gut* 54(9): 1293-7.
- de Madaria, E., J. Martínez, L. Sempere, B. Lozano, J. Sánchez-Payá, F. Uceda and M. Pérez-Mateo (2008). "Cytokine genotypes in acute pancreatitis: association with etiology, severity, and cytokine levels in blood." *Pancreas* 37(3): 295-301.
- de Madaria, E., G. Soler-Sala, I. Lopez-Font, P. Zapater, J. Martínez, L. Gómez-Escolar, C. Sánchez-Fortún, L. Sempere, J. Pérez-López, F. Lluís and M. Pérez-Mateo (2010). "Update of the Atlanta Classification of severity of acute pancreatitis: should a moderate category be included?" *Pancreatol* 10(5): 613-9.
- De Marchi, E., F. Baldassari, A. Bononi, M. R. Wieckowski and P. Pinton (2013). "Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C." *Oxid Med Cell Longev* 2013: 564961.
- de Vries, J. E., M. M. Vork, T. H. M. Roemen, Y. F. de Jong, J. P. M. Cleutjens, G. J. van der Vusse and M. van Bilsen (1997). "Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes." *J Lipid Res* 38:1384 –94.
- De Waele, J. J., U. J. Hesse, P. Pattyn, J. Decruyenaere and J. de Hemptinne (2000). "Postoperative lavage and on demand surgical intervention in the treatment of acute necrotizing pancreatitis." *Acta Chir Belg* 100(1): 16-20.
- Del Maestro, R., H. H. Thaw, J. Bjork, M. Planker and K. E. Arfors (1980). "Free radicals as mediators of tissue injury." *Acta Physiol Scand Suppl* 492: 43-57.
- Delannoy, E., A. Courtois, V. Freund-Michel, V. Leblais, R. Marthan and B. Muller (2010). "Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors." *Cardiovasc Res* 85(3): 582-92.

- Denham, W. and J. Norman (1999). "The potential role of therapeutic cytokine manipulation in acute pancreatitis." *Surg Clin North Am* 79(4): 767-81.
- Dervenis, C. (2000). "Assessments of severity and management of acute pancreatitis based on the Santorini Consensus Conference report." *Jop* 1(4): 178-82.
- Dib, M., X. Zhao, X. D. Wang and R. Andersson (2002). "Role of mast cells in the development of pancreatitis-induced multiple organ dysfunction." *Br J Surg* 89(2): 172-8.
- Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." *Annu Rev Immunol* 27: 519-50.
- Doelle, G. C. (2004). "The clinical picture of metabolic syndrome. An update on this complex of conditions and risk factors." *Postgrad Med* 116(1): 30-2, 35-8.
- Dromparis, P. and E. D. Michelakis (2012). "F2-isoprostanes: an emerging pulmonary arterial hypertension biomarker and potential link to the metabolic theory of pulmonary arterial hypertension?" *Chest* 142(4):816-20.
- Dugernier, T., P. F. Laterre, M. S. Reynaert (2000). "Ascites fluid in severe acute pancreatitis: from pathophysiology to therapy." *Acta Gastroenterol Belg* 63(3): 264-8.
- Edelson, J. D., P. Vadas, J. Villar, J. B. Mullen and W. Pruzanski (1991). "Acute lung injury induced by phospholipase A2. Structural and functional changes." *Am Rev Respir Dis* 143(5 Pt 1): 1102-9.
- Ellis, M. P., J. J. French and R. M. Charnley (2009). "Acute pancreatitis and the influence of socioeconomic deprivation." *Br J Surg* 96:74-80.
- Escobar, J., J. Pereda, A. Arduini, J. Sandoval, L. Sabater, L. Aparisi, G. López-Rodas and J. Sastre (2009). "Cross-talk between oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in acute pancreatitis: a key role for protein phosphatases." *Curr Pharm Des* 15:3027-42.
- Escobar, J., J. Pereda, A. Arduini, J. Sandoval, L. Sabater, L. Aparisi, M. Vento, G. López-Rodas and J. Sastre (2010). "Role of redox signaling, protein phosphatases and histone acetylation in the inflammatory cascade in acute pancreatitis. Therapeutic implications." *Inflamm Allergy Drug Targets* 9(2): 97-108.
- Escobar, J., J. Pereda, A. Arduini, J. Sandoval, M. L. Moreno, S. Pérez, L. Sabater, L. Aparisi, N. Cassinello, J. Hidalgo, L. A. Joosten, M. Vento, G. López-Rodas and J. Sastre (2012a). "Oxidative and nitrosative stress in acute pancreatitis. Modulation by pentoxifylline and oxypurinol." *Biochem Pharmacol* 83(1): 122-30.
- Escobar, J., J. Pereda, G. López-Rodas and J. Sastre (2012b). "Redox signaling and histone acetylation in acute pancreatitis." *Free Radic Biol Med* 52(5): 819-37.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur and H. Zollner (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." *Free Radic Biol Med* 11:81-128.
- Estores, D. and V. Velanovich (2013). "Barrett esophagus: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management." *Curr Probl Surg* 50(5): 192-226.
- Ethridge, R. T., D. H. Chung, M. Slogoff, R. A. Ehlers, M. R. Hellmich, S. Rajaraman, H. Saito, T. Uchida and B. M. Evers (2002). "Cyclooxygenase-2 gene disruption attenuates the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury." *Gastroenterology* 123(4): 1311-22.
- Eum, H. A., S. W. Park and S. M. Lee (2007). "Role of nitric oxide in the expression of hepatic vascular stress genes in response to sepsis." *Nitric Oxide* 17(3-4): 126-33.
- Fagan, K. A., I. F. McMurtry and D. M. Rodman (2001). "Role of endothelin-1 in lung disease." *Respir Res* 2(2): 90-101.
- Famm, S. S. and J. D. Morrow (2003). "The isoprostanes: Unique products of arachidonic acid oxidation." *Curr Med Chem* 10:1723-1740.

- Feddersen, C. O., S. Willemer, W. Karges, A. Puchner, G. Adler and P. V. Wichert (1991). "Lung injury in acute experimental pancreatitis in rats. II. Functional studies." *Int J Pancreatol* 8(4): 323-31.
- Figueiredo, R. T., P. L. Fernandez, D. S. Mourao-Sa, B. N. Porto, F. F. Dutra, L. S. Alves, M. F. Oliveira, P. L. Oliveira, A. V. Graça-Souza and M. T. Bozza (2007). "Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4." *J Biol Chem* 282(28): 20221-9.
- Fink, G. W. and J. G. Norman (1996). "Intrapancreatic interleukin-1beta gene expression by specific leukocyte populations during acute pancreatitis." *J Surg Res* 63(1): 369-73.
- Fisic, E., G. Poropat, L. Bilic-Zulle, V. Licul, S. Milic and D. Stimac (2013). "The Role of IL-6, 8, and 10, sTNF α , CRP, and Pancreatic Elastase in the Prediction of Systemic Complications in Patients with Acute Pancreatitis." *Gastroenterol Res Pract* 2013: 282645.
- Flegal, K. M., D. F. Williamson, E. R. Pamuk and H. M. Rosenberg (2004). "Estimating deaths attributable to obesity in the United States." *Am J Public Health* 94(9): 1486-9.
- Folch, E., A. Salas, J. Panes, E. Gelpi, J. Rosello-Catafau, D. C. Anderson, S. Navarro, J. M. Pique, L. Fernandez-Cruz and D. Closa (1999). "Role of P-selectin and ICAM-1 in pancreatitis-induced lung inflammation in rats: significance of oxidative stress." *Ann Surg* 230(6): 792-8; discussion 798-9.
- Folch, E., N. Prats, G. Hotter, S. Lopez, E. Gelpi, J. Rosello-Catafau and D. Closa (2000a). "P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis." *Dig Dis Sci* 45(8): 1535-44.
- Folch, E., D. Closa, E. Gelpí and J. Roselló-Catafau (2000b). "Effect of peritoneal lavage and lymph ligature on systemic complications of experimental acute pancreatitis." *Dig Dis Sci* 45(5): 909-14.
- Folch, E., A. Serrano, L. Sabater, E. Gelpi, J. Rosello-Catafau and D. Closa (2001). "Soluble receptors released during acute pancreatitis interfere with the detection of tumor necrosis factor-alpha." *Crit Care Med* 29(5): 1023-6.
- Fortes, G. B., L. S. Alves, R. de Oliveira, F. F. Dutra, D. Rodrigues, P. L. Fernandez, T. Souto-Padron, M. J. De Rosa, M. Kelliher, D. Golenbock, F. K. Chan and M. T. Bozza (2012). "Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production." *Blood* 119(10): 2368-75.
- Franco-Pons, N., S. Gea-Sorlí and D. Closa (2010). "Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis." *J Pathol* 221:175-82.
- Franco-Pons, N., J. Casas, G. Fabriàs, S. Gea-Sorlí, E. de Madaria, E. Gelpí and D. Closa (2013). "Fat necrosis generates proinflammatory halogenated lipids during acute pancreatitis." *Ann Surg* 257(5): 943-51.
- Fransen, M., M. Nordgren, B. Wang and O. Apanasets (2012). "Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease." *Biochim Biophys Acta* 1822(9): 1363-73.
- Frayling, T.M., N. J. Timpson, M. N. Weedon, E. Zeggini, R. M. Freathy, C. M. Lindgren, J. R. Perry, K. S. Elliott, H. Lango, N. W. Rayner, B. Shields, L. W. Harries, J. C. Barrett, S. Ellard, C. J. Groves, B. Knight, A. M. Patch, A. R. Ness, S. Ebrahim, D. A. Lawlor, S. M. Ring, Y. Ben-Shlomo, M. R. Jarvelin, U. Sovio, A. J. Bennett, D. Melzer, L. Ferrucci, R. J. Loos, I. Barroso, N. J. Wareham, F. Karpe, K. R. Owen, L. R. Cardon, M. Walker, G. A. Hitman, C. N. Palmer, A. S. Doney, A. D. Morris, G. D. Smith, A. T. Hattersley and M. I. McCarthy (2007). "A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity." *Science* 316(5826):889-94.
- Freeman, B. A. and J. Crapo (1982). "Biology of disease: Free radicals and tissue injury." *Lab. Invest.* 47: 412-426.

- Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action." *Am. J. Med.* 97(3A): 5S-13S.
- Fridovich, I. (1978). "Superoxide dismutases: defence against endogenous superoxide radical." *Ciba Found Symp*(65): 77-93.
- Fric, P., J. Slabý, E. Kasafírek, P. Kocna and J. Marek (1992). "Effective peritoneal therapy of acute pancreatitis in the rat with glutaryl-trialanin-ethylamide: a novel inhibitor of pancreatic elastase." *Gut* 33(5): 701-6.
- Frossard, J. L., A. Saluja, L. Bhagat, H. S. Lee, M. Bhatia, B. Hofbauer and M. L. Steer (1999). "The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury." *Gastroenterology* 116(3): 694-701.
- Frossard, J. L., P. Lescuyer and C. M. Pastor (2009). "Experimental evidence of obesity as a risk factor for severe acute pancreatitis." *World J Gastroenterol* 15(42): 5260-5.
- Fry, D. E. (1988). "Multiple system organ failure." *Surg Clin North Am* 68(1): 107-22.
- Fujita, M., A. Masamune, A. Satoh, Y. Sakai, K. Satoh and T. Shimosegawa (2001). "Ascites of a rat experimental model of severe acute pancreatitis induces lung injury." *Pancreas* 22: 409-18.
- Funnell, I. C., P. C. Bornman, S. P. Weakley, J. Terblanche and I. N. Marks (1993). "Obesity: an important prognostic factor in acute pancreatitis." *Br J Surg* 80(4): 484-6.
- Gaiser, S., J. Daniluk, Y. Liu, L. Tsou, J. Chu, W. Lee, D. S. Longnecker, C. D. Logsdon and B. Ji (2011). "Intracellular activation of trypsinogen in transgenic mice induces acute but not chronic pancreatitis." *Gut* 60(10): 1379-88.
- Gao, Z., D. Hwang, F. Bataille, M. Lefevre, D. York, M. J. Quon and J. Ye (2002). "Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex." *J Biol Chem* 277(50): 48115-21.
- Gea-Sorlí, S., R. Guillamat, A. Serrano-Mollar and D. Closa (2011). "Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis." *J Pathol* 223(3): 417-24.
- Gea-Sorlí, S., L. Bonjoch and D. Closa (2012). "Differences in the inflammatory response induced by acute pancreatitis in different white adipose tissue sites in the rat." *PLoS One* 7(8): e41933.
- Gómez-Cambronero, L., B. Camps, J. G. de La Asuncion, M. Cerda, A. Pellin, F. V. Pallardo, J. Calvete, J. H. Sweiry, G. E. Mann, J. Vina and J. Sastre (2000). "Pentoxifylline ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide." *J Pharmacol Exp Ther* 293(2): 670-6.
- Goyal, S.K. and A. Sharma (2013). "Atrial fibrillation in obstructive sleep apnea." *World J Cardiol* 5(6): 157-63.
- Grady, T., P. Liang, S. A. Ernst and C. D. Logsdon (1997). "Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis." *Gastroenterology* 113(6): 1966-75.
- Granell, S., J. Pereda, L. Gomez-Cambronero, N. Cassinello, L. Sabater, D. Closa and J. Sastre (2004). "Circulating TNF-alpha and its soluble receptors during experimental acute pancreatitis." *Cytokine* 25(4): 187-91.
- Grasso, D., A. Ropolo, A. Lo Ré, V. Boggio, M. I. Molejón, J. L. Iovanna, C. D. Gonzalez, R. Urrutia and M. I. Vaccaro (2011). "Zymophagy, a novel selective autophagy pathway mediated by VMP1-USP9x-p62, prevents pancreatic cell death." *J Biol Chem* 286(10): 8308-24.
- Grewal, H. P., M. Kotb, A. M. el Din, M. Ohman, A. Salem, L. Gaber and A. O. Gaber (1994). "Induction of tumor necrosis factor in severe acute pancreatitis and its subsequent reduction after hepatic passage." *Surgery* 115(2): 213-21.

- Guice, K. S., D. E. Miller, K. T. Oldham, C. M. Townsend, Jr. and J. C. Thompson (1986). "Superoxide dismutase and catalase: a possible role in established pancreatitis." *Am J Surg* 151(1): 163-9.
- Gukovskaya, A. S., E. Vaquero, V. Zaninovic, F. S. Gorelick, A. J. Lusa, M. L. Brennan, S. Holland and S. J. Pandol (2002). "Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis." *Gastroenterology* 122(4): 974-84.
- Gunjaca, I., J. Zunic, M. Gunjaca and Z. Kovac (2012). "Circulating cytokine levels in acute pancreatitis-model of SIRS/CARS can help in the clinical assessment of disease severity." *Inflammation* 35(2): 758-63.
- Gutiérrez, P. T., E. Folch-Puy, O. Bulbena and D. Closa (2008). "Oxidised lipids present in ascitic fluid interfere with the regulation of the macrophages during acute pancreatitis, promoting an exacerbation of the inflammatory response." *Gut* 57(5): 642-8.
- Haber, F. and J. Weiss (1932). "Über die Katalyse des Hydroperoxydes." *Naturwiss.* 20: 948.
- Habtezion, A., R. Kwan, E. Akhtar, S. P. Wanaski, S. D. Collins, R. J. Wong, D. K. Stevenson, E. C. Butcher and M. B. Omary (2011). "Panhematin provides a therapeutic benefit in experimental pancreatitis." *Gut* 60(5): 671-9.
- Halangk, W., M. M. Lerch, B. Brandt-Nedelev, W. Roth, M. Ruthenburger, T. Reinheckel, W. Domschke, H. Lippert, C. Peters and J. Deussing (2000). "Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis." *J Clin Invest* 106(6): 773-81.
- Halangk, W., B. Kruger, M. Ruthenburger, J. Sturzebecher, E. Albrecht, H. Lippert and M. M. Lerch (2002). "Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(2): G367-74.
- Hallenbeck, J. M. (2002). "The many faces of tumor necrosis factor in stroke." *Nat Med* 8(12): 1363-8.
- Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease." *Am. J. Med.* 91(3C): 14S-22S.
- Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?" *Lancet* 344: 721-724.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems." *Free Radic Biol Med* 18(1): 125-6.
- Halliwell, B. (2011). "Free radicals and antioxidants - quo vadis?" *Trends Pharmacol Sci* 32(3): 125-30.
- Hamid, Q., D. R. Springall, V. Riveros-Moreno, P. Chanez, P. Howarth, A. Redington, J. Bousquet, P. Godard, S. Holgate and J. M. Polak (1993). "Induction of nitric oxide synthase in asthma." *Lancet* 342(8886-8887): 1510-3.
- Han, Y., C. J. Haines and H. L. Feng (2007). "Role(s) of the serine/threonine protein phosphatase 1 on mammalian sperm motility." *Arch Androl* 53: 169-77.
- Hariri, M., A. Slivka, D. L. Carr-Locke and P. A. Banks (1994). "Pseudocyst drainage predisposes to infection when pancreatic necrosis is unrecognized." *Am J Gastroenterol* 89(10): 1781-4.
- Hashimoto, D., M. Ohmuraya, M. Hirota, A. Yamamoto, K. Suyama, S. Ida, Y. Okumura, E. Takahashi, H. Kido, K. Araki, H. Baba, N. Mizushima and K. Yamamura (2008). "Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells." *J Cell Biol* 181(7): 1065-72.
- Haslam, D. W. and W. P. James (2005). "Obesity." *Lancet* 366 (9492): 197-209.
- Hecker, M. and V. Ullrich (1989). "On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis." *J Biol Chem* 264: 141-50.

- Herman, R., K. E. Guire, R. S. Burd, D. P. Mooney and P. F. Ehrlich (2011). "Utility of amylase and lipase as predictors of grade of injury or outcomes in pediatric patients with pancreatic trauma." *J Pediatr Surg* 46(5): 923-6.
- Hernández, V., M. Miranda, I. Pascual, V. Sanchiz, P. Almela, R. Añón, E. Cuadrado, M. I. Sanz, M. Mínguez, F. Mora, F. J. Romero and A. Benages (2011). "Malondialdehyde in early phase of acute pancreatitis." *Rev Esp Enferm Dig* 103(11): 563-9.
- Hierholzer, C. and T. R. Billiar (2001). "Molecular mechanisms in the early phase of hemorrhagic shock." *Langenbecks Arch Surg* 386(4): 302-8.
- Hietaranta, A., E. Kempainen, P. Puolakkainen, V. Sainio, R. Haapiainen, H. Peuravuori, E. Kivilaakso and T. Nevalainen (1999). "Extracellular phospholipases A2 in relation to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and systemic complications in severe acute pancreatitis." *Pancreas* 18(4): 385-91.
- Higuchi, Y. (2004). "Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis." *J Cell Mol Med* 8(4): 455-64.
- Hirano, T., T. Manabe and T. Tobe (1992). "Cytoprotective effects of prostaglandins and a new potent protease inhibitor in acute pancreatitis." *Am J Med Sci* 304(3): 154-63.
- Höfken, T., N. Keller, F. Fleischer, B. Göke and A. C. Wagner (2000). "Map kinase phosphatases (MKP's) are early responsive genes during induction of cerulein hyperstimulation pancreatitis." *Biochem Biophys Res Commun* 276(2): 680-5.
- Hommes, D., B. van den Blink, T. Plasse, J. Bartelsman, C. Xu, B. Macpherson, G. Tytgat, M. Peppelenbosch and S. Van Deventer (2002). "Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease." *Gastroenterology* 122(1): 7-14.
- Hong, S., B. Qiwen, J. Ying, A. Wei and T. Chaoyang (2011). "Body mass index and the risk and prognosis of acute pancreatitis: a meta-analysis." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 23(12): 1136-43.
- Hoque, R., M. Sohail, A. Malik, S. Sarwar, Y. Luo, A. Shah, F. Barrat, R. Flavell, F. Gorelick, S. Husain and W. Mehal (2011). "TLR9 and the NLRP3 inflammasome link acinar cell death with inflammation in acute pancreatitis." *Gastroenterology* 141(1): 358-69.
- Hotamisligil, G. S., D. L. Murray, L. N. Choy and B. M. Spiegelman (1994). "Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11): 4854-8.
- Hou, X., F. Gobeil, K. Peri, G. Speranza, A. M. Marrache, P. Lachapelle, L. J. Roberts II, D. R. Varma and S. Chemtob (2000). "Augmented vasoconstriction and thromboxane formation by 15-F2t-isoprostane (8-iso-PGF2 α) in immature pig periventricular brain microvessels." *Stroke* 31: 516-25.
- Hsu, P. C., T. H. Lin, H. M. Su, Z. Y. Lin, W. T. Lai and S. H. Sheu (2010). "Acute necrotizing pancreatitis complicated with ST elevation acute myocardial infarction: a case report and literature review." *Kaohsiung J Med Sci* 26(4): 200-5.
- Hu, Y., J. Liu and H. Huang (2013). "Recent agents targeting HIF-1 α for cancer therapy." *J Cell Biochem* 114(3): 498-509.
- Huang, H., Y. Liu, J. Daniluk, S. Gaiser, J. Chu, H. Wang, Z. S. Li, C. D. Logsdon and B. Ji (2013). "Activation of nuclear factor- κ B in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice." *Gastroenterology* 144(1): 202-10.
- Huang, J. Y., M. T. Chianga and L. Y. Chau (2013). "Adipose overexpression of heme oxygenase-1 does not protect against high fat diet-induced insulin resistance in mice." *PLoS One* 8(2): e55369.

- Huang, R. B., A. L. Gonzalez and O. Eniola-Adefeso (2013). "Laminar shear stress elicit distinct endothelial cell E-selectin expression pattern via TNF α and IL-1 β activation." *Biotechnol Bioeng* 110(3): 999-1003.
- Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." *Cell* 80: 225-236.
- Imig, J. D., C. Dimitropoulou, D. S. Reddy, R. E. White and J. R. Falck (2008). "Afferent arteriolar dilation to 11, 12-EET analogs involves PP2A activity and Ca²⁺-activated K⁺ Channels." *Microcirculation* 15:137-50.
- Irwin, D. C., J. M. McCord, E. Nozik-Grayck, G. Beckly, B. Foreman, T. Sullivan, M. White, J. Jr. Crossno, D. Bailey, S. C. Flores, S. Majka, D. Klemm and M. C. van Patot (2009). "A potential role for reactive oxygen species and the HIF-1 α -VEGF pathway in hypoxia-induced pulmonary vascular leak." *Free Radic Biol Med* 47(1): 55-61.
- Jackson, M. D. and J. M. Denu (2001). "Molecular reactions of protein phosphatases--insights from structure and chemistry." *Chem Rev* 101(8) :2313-40.
- James, P. T., N. Rigby and R. Leach; International Obesity Task Force (2004). "The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies." *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 11(1) :3-8.
- Janz, D. R., J. A. Bastarache, J. F. Peterson, G. Sills, N. Wickersham, A. K. May, L. J. 2nd Roberts and L. B. Ware (2013). "Association between cell-free hemoglobin, acetaminophen, and mortality in patients with sepsis: an observational study." *Crit Care Med* 41(3): 784-90.
- Jarvis, L. A., S. J. Toering, M. A. Simon, M. A. Krasnow, R. K. Smith-Bolton (2006). "Sprouty proteins are in vivo targets of Corkscrew/SHP-2 tyrosine phosphatases." *Development* 133(6): 1133-42.
- Ji, B., S. Gaiser, X. Chen, S. A. Ernst and C. D. Logsdon (2009). "Intracellular trypsin induces pancreatic acinar cell death but not NF- κ B activation." *J Biol Chem* 284(26): 17488-98.
- Jiang, C. Y., W. Wang, J. X. Tang and Z. R. Yuan (2013). "The adipocytokine resistin stimulates production of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in pancreatic acinar cells via NF- κ B activation." *J Endocrinol Invest*.
- Jiang, H., Y. Huang, H. Xu, R. Hu and Q. F. Li (2012). "Inhibition of hypoxia inducible factor-1 α ameliorates lung injury induced by trauma and hemorrhagic shock in rats." *Acta Pharmacol Sin* 33(5): 635-43.
- Jocelyn, P. C. (1973). *Biochemistry of the SH group*.
- Johnson, C. D., A. N. Kingsnorth, C. W. Imrie, M. J. McMahon, J. P. Neoptolemos, C. McKay, S. K. Toh, P. Skaife, P. C. Leeder, P. Wilson, M. Larvin and L. D. Curtis (2001). "Double blind, randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis." *Gut* 48(1): 62-9.
- Johnson, C. D., S. K. Toh and M. J. Campbell (2004). "Combination of APACHE-II score and an obesity score (APACHE-O) for the prediction of severe acute pancreatitis." *Pancreatology* 4(1): 1-6.
- Jung, K. H., S. W. Hong, H. M. Zheng, H. S. Lee, H. Lee, D. H. Lee, S. Y. Lee and S. S. Hong (2010). "Melatonin ameliorates cerulein-induced pancreatitis by the modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor- κ B in rats." *J Pineal Res* 48(3): 239-50.
- Kahn, B. B. and J. S. Flier (2000). "Obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* 106(4): 473-81.
- Kaner, R. J., J. V. Ladetto, R. Singh, N. Fukuda, M. A. Matthay and R. G. Crystal (2000). "Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema." *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 657-64.

- Kaplan, J. M., M. Nowell, P. Lahni, M. P. O'Connor, P. W. Hake and B. Zingarelli (2012). "Short-term high fat feeding increases organ injury and mortality after polymicrobial sepsis." *Obesity (Silver Spring)* 20(10): 1995-2002.
- Kapralov, A., I. I. Vlasova, W. Feng, A. Maeda, K. Walson, V. A. Tyurin, Z. Huang, R. K. Aneja, J. Carcillo, H. Bayir, and V. E. Kagan (2009). "Peroxidase activity of hemoglobin-haptoglobin complexes: covalent aggregation and oxidative stress in plasma and macrophages." *J Biol Chem* 284: 30395-407.
- Kauste, A., K. Höckerstedt, J. Ahonen and H. Tervaskari (1983). "Peritoneal lavage as a primary treatment in acute fulminant pancreatitis." *Surg Gynecol Obstet* 156(4): 458-63.
- Kawahara, T., M. T. Quinn and J. D. Lambeth (2007). "Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes." *BMC Evol Biol* 7: 109.
- Kilberg, M. S., H. N. Christensen and M. E. Handlogten (1979). "Cysteine as a system-specific substrate for transport system ASC in rat hepatocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 88(2): 744-51.
- Kim, M. S., K. P. Lee, D. Yang, D. M. Shin, J. Abramowitz, S. Kiyonaka, L. Birnbaumer, Y. Mori and S. Muallem (2011). "Genetic and pharmacologic inhibition of the Ca²⁺ influx channel TRPC3 protects secretory epithelia from Ca²⁺-dependent toxicity." *Gastroenterology* 140(7): 2107-15, 2115.e1-4.
- Koh, Y. Y., W. K. Jeon, Y. K. Cho, H. J. Kim, W. G. Chung, C. U. Chon, T. Y. Oh and J. H. Shin (2012). "The effect of intestinal permeability and endotoxemia on the prognosis of acute pancreatitis." *Gut Liver* 6(4): 505-11.
- Koike, H., M. L. Steer and J. Meldolesi (1982). "Pancreatic effects of ethionine: blockade of exocytosis and appearance of crinophagy and autophagy precede cellular necrosis." *Am J Physiol* 242(4): G297-307.
- Kollef, M. H. and D. P. Schuster (1995). "The acute respiratory distress syndrome." *N Engl J Med* 332(1): 27-37.
- Kotenko, S. V., L. S. Izotova, O. V. Mirochnitchenko, E. Esterova, H. Dickensheets, R. P. Donnelly and S. Pestka (2001). "Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes." *J Biol Chem* 276(4): 2725-32.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* 81(2): 807-69.
- La Mura, V., J. C. Reverter, A. Flores-Arroyo, S. Raffa, E. Reverter, S. Seijo, J. G. Abalde, J. Bosch and J. C. García-Pagán (2011). "Von Willebrand factor levels predict clinical outcome in patients with cirrhosis and portal hypertension." *Gut* 60(8): 1133-8.
- Lagan, A. L., D. D. Melley, T. W. Evans and G. J. Quinlan (2008). "Pathogenesis of the systemic inflammatory syndrome and acute lung injury: role of iron mobilization and decompartmentalization." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(2): L161-74.
- Lambeth, J. D. (2007). "Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy." *Free Radic Biol Med* 43(3): 332-47.
- Lankisch, P. G., A. B. Lowenfels and P. Maisonneuve (2002). "What is the risk of alcoholic pancreatitis in heavy drinkers?" *Pancreas* 25(4): 411-2.
- Lasson, A., G. Balldin, S. Genell and K. Ohlsson (1984). "Peritoneal lavage in severe acute pancreatitis." *Acta Chir Scand* 150(6): 479-84.
- Lee, K. and W. J. Esselman (2002). "Inhibition of PTPs by H₂O₂ regulates the activation of distinct MAPK pathways." *Free Radic Biol Med* 33: 1121-32.

- Lee, P. C., Y. Nakashima, H. E. Appert and J. M. Howard (1979). "Lipase and colipase in canine pancreatic juice as etiologic factors in fat necrosis." *Surg Gynecol Obstet* 148: 39-44.
- Lehtola, A. (1986). "Peritoneal blood flow during acute experimental pancreatitis. The role of peritoneal exudate." *Scand J Gastroenterol* 21(6): 756-60.
- Lenhart, D. K. and E. J. Balthazar (2008). "MDCT of acute mild (nonnecrotizing) pancreatitis: abdominal complications and fate of fluid collections." *AJR Am J Roentgenol* 190(3): 643-9.
- Lerch, M. M., A. K. Saluja, M. Runzi, R. Dawra, M. Saluja and M. L. Steer (1993). "Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum." *Gastroenterology* 104(3): 853-61.
- Leung, P. S. and Y. C. Chan (2009). "Role of oxidative stress in pancreatic inflammation." *Antioxid Redox Signal* 11, 135-165.
- Li, Q., N. Y. Spencer, F. D. Oakley, G. R. Buettner and J. F. Engelhardt (2009). "Endosomal Nox2 facilitates redox-dependent induction of NF-kappaB by TNF-alpha." *Antioxid Redox Signal* 11(6): 1249-63.
- Lires-Dean, M., B. Carames, B. Cillero-Pastor, F. Galdo, M. J. Lopez-Armada and F. J. Blanco (2008). "Anti-apoptotic effect of transforming growth factor-beta1 on human articular chondrocytes: role of protein phosphatase 2A." *Osteoarthritis Cartilage* 16: 1370-78.
- Lisk, C., D. Kominsky, S. Ehrentraut, J. Bonaventura, R. Nuss, K. Hassell, E. Nozik-Grayck and D. C. Irwin (2013). "Hemoglobin-Induced Endothelial Cell Permeability is Controlled, In-Part, Via an MyD88-Dependent Signaling Mechanism." *Am J Respir Cell Mol Biol* May 28.
- Liu, C., T. Tazzeo, A. Guy, T. Durand and L. J. Janssen (2007). "Pharmacological actions of isoprostane metabolites and phytoprostanes in human and bovine pulmonary smooth muscles." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 76(1): 57-64.
- Lombardi, B., L. W. Estes and D. S. Longnecker (1975). "Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet." *Am J Pathol* 79(3): 465-80.
- Lu, S. C. (1999). "Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies." *Faseb J* 13(10): 1169-83.
- Lu, S. C., I. Gukovsky, A. Lugea, C. N. Reyes, Z. Z. Huang, L. Chen, J. M. Mato, T. Bottiglieri and S. J. Pandol (2003). "Role of S-adenosylmethionine in two experimental models of pancreatitis." *FASEB J* 17: 56-8.
- Luan, Z. G., J. Zhang, X. H. Yin, X. C. Ma and R. X. Guo (2013). "Ethyl pyruvate significantly inhibits tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and high mobility group box 1 releasing and attenuates sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis associated with acute lung injury." *Clin Exp Immunol* 172(3): 417-26.
- Lundberg, A. H., N. Granger, J. Russell, S. Callicutt, L. W. Gaber, M. Kotb, O. Sabek and A. O. Gaber (2000). "Temporal correlation of tumor necrosis factor-alpha release, upregulation of pulmonary ICAM-1 and VCAM-1, neutrophil sequestration, and lung injury in diet-induced pancreatitis." *J Gastrointest Surg* 4(3): 248-57.
- Luthen, R., C. Niederau, M. Niederau, L. D. Ferrell and J. H. Grendell (1995). "Influence of ductal pressure and infusates on activity and subcellular distribution of lysosomal enzymes in the rat pancreas." *Gastroenterology* 109(2): 573-81.
- Mareninova, O. A., K. Hermann, S. W. French, M. S. O'Konski, S. J. Pandol, P. Webster, A. H. Erickson, N. Katunuma, F. S. Gorelick, I. Gukovsky and A. S. Gukovskaya (2009). "Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis." *J Clin Invest* 119(11): 3340-55.
- Marnett, L. J. (1999). "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde." *Mutat Res* 424: 83-95.

- Marshall, J.C., D. J. Cook, N. V. Christou, G. R. Bernard, C. L. Sprung and W. J. Sibbald (1995). "Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome." *Crit Care Med* 23(10):1638-52.
- Martínez, J., J. Sánchez-Payá, J. M. Palazón, J. R. Aparicio, A. Picó and M. Pérez-Mateo (1998). "Obesity: a prognostic factor for severe acute biliary and alcoholic pancreatitis." *Am J Gastroenterology* 93: 1324-28.
- Martínez, J., J. Sánchez-Payá, J. M. Palazón, J. Suazo-Barahona, G. Robles-Díaz and M. Pérez-Mateo (2004). "Is obesity a risk factor in acute pancreatitis? A meta-analysis." *Pancreatology* 4: 42-8.
- Martínez, J., C. D. Jhonson, J. Sánchez-Payá, E. de Madaria, G. Robles-Díaz and M. Pérez-Mateo (2006). "Obesity is a definitive risk factor of severity and mortality in acute pancreatitis: an updated meta-analysis." *Pancreatology* 6: 206-09.
- Martinon, F., A. Mayor and J. Tschopp (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." *Annu Rev Immunol* 27: 229-65.
- Mathes, W. F., S. A. Kelly and D. Pomp (2011). "Advances in comparative genetics: influence of genetics on obesity." *Br J Nutr* 106 Suppl 1: S1-10.
- Mayer, A. D., M. J. McMahon, A. P. Corfield, M. J. Cooper, R. C. Williamson, A. P. Dickson, M. G. Shearer and C. W. Imrie (1985). "Controlled clinical trial of peritoneal lavage for the treatment of severe acute pancreatitis." *N Engl J Med* 312(7): 399-404.
- Mayer, J., B. Rau, F. Gansauge and H. G. Beger (2000). "Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications." *Gut* 47(4): 546-52.
- Mayerle, J., A. Dummer, M. Sendler, S. R. Malla, C. van den Brandt, S. Teller, A. Aghdassi, C. Nitsche and M. M. Lerch (2012). "Differential roles of inflammatory cells in pancreatitis." *J Gastroenterol Hepatol* 27 Suppl 2:47-51.
- Mazza, C. (2001). "Obesidad en pediatría: Panorama actual." *Obesidad* 12 (1): 28-30.
- McCord, J. M., B. B. Keele and Y. Fridovich (1974). "An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci USA* 41: 35-97.
- McCutcheon, A. and D. Race (1962). "Experimental pancreatitis: a possible etiology of post-operative pancreatitis." *Ann Surg* 155: 523-531.
- McKay, C. J., G. Gallagher, B. Brooks, C. W. Imrie and J. N. Baxter (1996). "Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis." *Br J Surg* 83(7): 919-23.
- Medzhitov, R. (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." *Nature* 454(7203): 428-35.
- Medzhitov, R., E. M. Shevach, G. Trinchieri, A. L. Mellor, D. H. Munn, S. Gordon, P. Libby, G. K. Hansson, K. Shortman, C. Dong, D. Gabrilovich, L. Gabryšová, A. Howes and A. O'Garra (2011). "Highlights of 10 years of immunology in Nature Reviews Immunology." *Nat Rev Immunol* 11(10): 693-702.
- Meister, A. and M. E. Anderson (1983). "Glutathione." *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.
- Meister, A. (1988). "On the discovery of glutathione." *Trends Biochem Sci* 13(5): 185-8.
- Meister, T., R. Niehues, D. Hahn, W. Domschke, M. Sendler, M. M. Lerch and J. Schneckeburger (2010). "Missorting of cathepsin B into the secretory compartment of CLMPRI/IGFII-deficient mice does not induce spontaneous trypsinogen activation but leads to enhanced trypsin activity during experimental pancreatitis--without affecting disease severity." *J Physiol Pharmacol* 61(5): 565-75.

- Méndez-Sánchez, N., N. C. Chávez-Tapia, A. R. Villa, K. Sánchez-Lara, D. Zamora-Valdés, M. H. Ramos and M. Uribe (2005). "Adiponectin as a protective factor in hepatic steatosis." *World J Gastroenterol* 11(12): 1737-41.
- Meng, K., Q. Liu, Y. Dou and Q. Huang (2013). "Prior peritoneal lavage with hot 0.9 % saline induces HSP70 expression and protects against cerulein-induced acute pancreatitis in rats." *Mol Biol Rep* 40(2): 1443-9.
- Mihara, M., M. Hashizume, H. Yoshida, M. Suzuki and M. Shiina (2012). "IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions." *Clin Sci (Lond)* 122(4): 143-59.
- Mitsuhashi, S., N. Matsuura, M. Ubukata, H. Oikawa, H. Shima and K. Kikuchi (2001). "Tautomycetin is a novel and specific inhibitor of serine/threonine protein phosphatase type 1, PP1." *Biochem Biophys Res Commun* 287: 328-31.
- Mizunuma, T., S. Kawamura and Y. Kishino (1984). "Effects of injecting excess arginine on rat pancreas." *J Nutr* 114(3): 467-71.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori and Y. Ohsumi (2004). "In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker." *Mol Biol Cell* 15(3): 1101-11.
- Mockus (2001) "Leptina: Regulación y Asociaciones en la obesidad." *Salud UIS* 33: 84-89.
- Mofidi, R., M. D. Duff, S. J. Wigmore, K. K. Madhavan, O. J. Garden and R. W. Parks (2006). "Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis." *Br J Surg* 93(6):738-44.
- Moldovan, L., K. Mythreye, P. J. Goldschmidt-Clermont and L. L. Satterwhite (2006). "Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1." *Cardiovasc Res* 71(2): 236-46.
- Monteiro, A. P., C. S. Pinheiro, T. Luna-Gomes, L. R. Alves, C. M. Maya-Monteiro, B. N. Porto, C. Barja-Fidalgo, C. F. Benjamim, M. Peters-Golden, C. Bandeira-Melo, M. T. Bozza and C. Canetti (2011). "Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme." *J Immunol* 186(11): 6562-7.
- Montine, T. J., M. D. Neely, J. F. Quinn, M. F. Beal, W. R. Markesbery, L. J. Roberts II and J. D. Morrow (2002). "Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease." *Free Radic Biol Med* 33: 620-26.
- Montuschi, P., M. Corradi, G. Ciabattini, J. Nightingale, S. J. Kharitonov and P. J. Barnes (1999). "Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients." *Am J Respir Crit Care Med* 160: 216-20.
- Mooren, F. C., V. Hlouschek, T. Finkes, S. Turi, I. A. Weber, J. Singh, W. Domschke, J. Schnekenburger, B. Krüger and M. M. Lerch (2003). "Early changes in pancreatic acinar cell calcium signaling after pancreatic duct obstruction." *J Biol Chem* 278(11): 9361-9.
- Morrow, J. D., K. E. Hill, R. F. Burk, T. M. Nammour, K. F. Badr and L. J. Roberts II (1990). "A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism." *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9383-87.
- Morrow, J. D. and L. J. Roberts II (1997). "The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation." *Prog Lipid Res* 36: 1-21.
- Muili, K. A., D. Wang, A. I. Orabi, S. Sarwar, Y. Luo, T. A. Javed, J. F. Eisses, S. M. Mahmood, S. Jin, V. P. Singh, M. Ananthanarayanan, G. Perides, J. A. Williams, J. D. Molkenkin and S. Z. Husain (2013). "Bile acids induce pancreatic acinar cell injury and pancreatitis by activating calcineurin." *J Biol Chem* 288(1): 570-80.
- Münzberg, H., J. S. Flier and C. Bjørbaek (2004). "Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice." *Endocrinology* 145(11): 4880-9.

- Mura, M., C. C. dos Santos, D. Stewart and M. Liu (2004). "Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury." *J Appl Physiol* 97(5): 1605-17.
- Murr, M. M., J. Yang, A. Fier, P. R. Foulis, T. P. Loughorn II, P. K. Epling-Burnette and J. G. Norman (2002). "Pancreatitis-associated ascitic fluid induces hepatocyte death independent of local cytokines." *J Surg Res* 106: 308-13.
- Naik, E. and V. M. Dixit (2011). "Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production." *J Exp Med* 208: 417-20.
- Nakae, Y., S. Naruse, M. Kitagawa, S. Hirao, R. Yamamoto and T. Hayakawa (1995). "Activation of trypsinogen in experimental models of acute pancreatitis in rats." *Pancreas* 10(3): 306-13.
- Napetschnig, J. and H. Wu (2013). "Molecular basis of NF- κ B signaling." *Annu Rev Biophys* 42: 443-68.
- Naskalski, J. W., B. Kusnierz-Cabala, B. Kedra, P. Dumnicka, J. Panek and B. Maziarz (2007). "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: 129-34.
- Navarro, S., M. Pérez-Mateo and L. Guarner (2002). *Tratado de páncreas exocrino*. Barcelona, J&C Ediciones Médicas S.L.
- Navina, S., C. Acharya, J. P. DeLany, L. S. Orlichenko, C. J. Baty, S. S. Shiva, C. Durgampudi, J. M. Karlsson, K. Lee, K. T. Bae, A. Furlan, J. Behari, S. Liu, T. McHale, L. Nichols, G. I. Papachristou, D. Yadav, V. P. Singh (2011). "Lipotoxicity causes multisystem organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity." *Sci Transl Med* 3(107): 107ra110.
- N.E.A.U.E. (1999). "Decisión del Consejo de 23 de Marzo de 1998 relativa a la celebración por la Comunidad del Convenio Europeo sobre la protección de animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos." *DOCE L*.
- Neoptolemos, J. P., M. Raraty, M. Finch and R. Sutton (1998). "Acute pancreatitis: the substantial human and financial costs." *Gut* 42(6): 886-91.
- Neumann, B., N. Zantl, A. Veihermann, K. Emmanuilidis, K. Pfeffer, C. D. Heidecke and B. Holzmann (1999). "Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis." *Int Immunol* 11(2): 217-27.
- Nicolai, A., M. Li, D. H. Kim, S. J. Peterson, L. Vanella, V. Positano, A. Gastaldelli, R. Rezzani, L. F. Rodella, G. Drummond, C. Kusmic, A. L'Abbate, A. Kappas and N. G. Abraham (2009). "Heme oxygenase-1 induction remodels adipose tissue and improves insulin sensitivity in obesity-induced diabetic rats." *Hypertension* 53(3): 508-15.
- Nikolaidis, M. G., A. Kyparos, C. Spanou, V. Paschalis, A. A. Theodorou and I. S. Vrabas (2012). "Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues." *J Exp Biol* 215(Pt 10): 1615-25.
- Niederau, C., R. A. Crass, G. Silver, L.D. Ferrell and J. h. Grendell (1988). "Therapeutic regimens in acute experimental hemorrhagic pancreatitis. Effects of hydration, oxygenation, peritoneal lavage, and a potent protease inhibitor." *Gastroenterology* 95:1648-57.
- Niederau, C. H. Klonowski, H. U. Schulz, M. Sarbia, R. Luthen and D. Haussinger (1996). "Oxidative injury to isolated rat pancreatic acinar cells vs. isolated zymogen granules." *Free Radic Biol Med* 20: 877-86.
- Nielsen, M. J., H. J. Møller and S. K. Moestrup (2010). "Hemoglobin and heme scavenger receptors." *Antioxid Redox Signal* 12(2): 261-73.
- Norman, J. G., G. W. Fink and M. G. Franz (1995). "Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression." *Arch Surg* 130(9): 966-70.

- Norman, J. G. (1998). "The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis." *Am J Surg* 175(1): 76-83.
- Nuhn, P., T. Mitkus, G. O. Ceyhan, B. M. Künzli, F. Bergmann, L. Fischer, N. Giese, H. Friess and P. O. Berberat (2013). "Heme oxygenase 1-generated carbon monoxide and biliverdin attenuate the course of experimental necrotizing pancreatitis." *Pancreas* 42(2): 265-71.
- Nystrom, P.O. (1998). "The systemic inflammatory response syndrome: definitions and etiology." *J Antimicrob Chemother* 41: 1-7.
- Odinokova, I. V., K. F. Sung, O. A. Mareninova, K. Hermann, Y. Evtodienko, A. Andreyev, I. Gukovsky and A. S. Gukovskaya (2009). "Mechanisms regulating cytochrome c release in pancreatic mitochondria." *Gut* 58(3): 431-42.
- Okazawa, A., I. Kawikova, Z. H. Cui, B. E. Skoogh and J. Lotvall (1997). "8-Epi-PGF2 α induces airflow obstruction and airway plasma exudation in vivo." *Am J Respir Crit Care Med* 155: 436-41.
- Old, L. J. (1988). "Tumor necrosis factor." *Sci Am* 258(5): 59-60, 69-75.
- Oliver, C. J. and S. Shenolikar (1998). "Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors." *Front Biosci* 3: 961-72.
- Opie, E. (1901). "The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis." *Bull Johns Hopkins Hosp* 12: 182-192.
- Oppenheimer, L., V. P. Wellner, O. W. Griffith and A. Meister (1979). "Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites." *J Biol Chem* 254(12): 5184-90.
- Otani, T., S. M. Chepilko, J. H. Grendell and F. S. Gorelick (1998). "Codistribution of TAP and the granule membrane protein GRAMP-92 in rat caerulein-induced pancreatitis." *Am J Physiol* 275(5 Pt 1): G999-G1009.
- Ozturk, F., M. Gul, M. Esrefoglu and B. Ates (2008). "The contradictory effects of nitric oxide in caerulein-induced acute pancreatitis in rats." *Free Radic Res* 42(4): 289-96.
- Pandol, S. J., A. K. Saluja, C. W. Imrie and P. A. Banks (2007). "Acute pancreatitis: bench to the bedside." *Gastroenterology* 132(3): 1127-51.
- Papachristou, G. I. (2008). "Prediction of severe acute pancreatitis: Current knowledge and novel insights." *World J Gastroenterol* 14: 6273-75.
- Pappas, T. N., V. C. Gavino, E. C. Ellison, D. G. Cornwell, W. G. Pace and L. C. Carey (1981). "Concentration of FFA in pancreatitis associated ascitic fluid." *Clin Chem* 27: 358.
- Park, B. K., J. B. Chung, J. H. Lee, J. H. Suh, S. W. Park, S. Y. Song, H. Kim, K. H. Kim and J. K. Kang (2003). "Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis." *World J Gastroenterol* 9(10): 2266-9.
- Park, S., N. Y. Park, G. Valacchi and Y. Lim (2012). "Calorie restriction with a high-fat diet effectively attenuated inflammatory response and oxidative stress-related markers in obese tissues of the high diet fed rats." *Mediators Inflamm* 2012: 984643.
- Parsons, J. K., A. V. Sarma, K. McVary and J. T. Wei (2013). "Obesity and benign prostatic hyperplasia: clinical connections, emerging etiological paradigms and future directions." *J Urol* 189(1 Suppl): S102-6.
- Pastor, C. M., M. A. Matthay and J. L. Frossard (2003). "Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights." *Chest* 2003 124(6): 2341-51.
- Peery, A. F., E. S. Dellon, J. Lund, S. D. Crockett, C. E. McGowan, W. J. Bulsiewicz, L. M. Gangarosa, M. T. Thiny, K. Stizenberg, D. R. Morgan, Y. Ringel, H. P. Kim, M. D. Dibonaventura, C. F. Carroll, J. K. Allen, S. F. Cook, R. S. Sandler, M. D. Kappelman and N. J.

- Shaheen (2012). "Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update." *Gastroenterology* 143(5): 1179-87.
- Pereda, J., L. Sabater, N. Cassinello, L. Gomez-Cambronero, D. Closa, E. Folch-Puy, L. Aparisi, J. Calvete, M. Cerda, S. Lledo, J. Vina and J. Sastre (2004). "Effect of simultaneous inhibition of TNF-alpha production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases." *Ann Surg* 240(1): 108-16.
- Pereda, J., L. Sabater, L. Aparisi, J. Escobar, J. Sandoval, J. Viña, G. López-Rodas and J. Sastre (2006). "Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis." *Curr Med Chem* 13(23): 2775-87.
- Pérez-Galán, P., G. Roue, M. López-Guerra, M. Nguyen, N. Villamor, E. Montserrat, G. C. Shore, E. Campo and D. Colomer (2008). "BCL-2 phosphorylation modulates sensitivity to the BH3 mimetic GX15-070 (Obatoclox) and reduces its synergistic interaction with bortezomib in chronic lymphocytic leukemia cells." *Leukemia* 22: 1712-20.
- Perez-Leighton, C. E., C. J. Billington and C. M. Kotz (2013). "Orexin modulation of adipose tissue." *Biochim Biophys Acta*
- Petejova, N. and A. Martinek (2013). "Acute kidney injury following acute pancreatitis: A review". *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 157(2): 105-13.
- Petrakis, I., N. Vrachassotakis, N. Kogerakis, V. Koutsoumpas and G. Chalkiadakis (2000). "Subacute pancreatic necrosis." *Panminerva Med* 42(4): 279-86.
- Petrov, M.S., S. Shanbhag, M. Chakraborty, A. R. Phillips and J. A. Windsor (2010). "Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis." *Gastroenterology* 139(3): 813-20.
- Platell, C., D. Cooper and J. C. Hall (2001). "A meta-analysis of peritoneal lavage for acute pancreatitis." *J Gastroenterol Hepatol* 16: 689-93.
- Porto, B. N., L. S. Alves, P. L. Fernández, T. P. Dutra, R. T. Figueiredo, A. V. Graça-Souza, and M. T. Bozza (2007). "Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors." *J Biol Chem* 282(33): 24430-6.
- Praticò, D., J. A. Lawson, J. Rokach and G. A. Fitzgerald (2001). "The isoprostanes in biology and medicine." *Trends Endocrinol Metab* 2: 243-47.
- Pryor, W .A. and J .P. Stanley (1975). "A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation." *J Org Chem* 40: 3615-17.
- Pryor, W. A., G. L. Squadrito and M. Friedman (1995). "A new mechanism for the toxicity of ozone." *Toxicol Lett* 82-83: 287-93.
- Que, R. S., L. P. Cao, G. P. Ding, J. A. Hu, K. J. Mao and G. F. Wang (2010). "Correlation of nitric oxide and other free radicals with the severity of acute pancreatitis and complicated systemic inflammatory response syndrome". *Pancreas* 39(4): 536-40.
- Ramnath, R. D., J. Sun, S. Adhikari, L. Zhi and M. Bhatia (2008). "Role of PKC-delta on substance P-induced chemokine synthesis in pancreatic acinar cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 294(3): C683-92.
- Rämö, O. J., P. Jalovaara, A. Mäkelä and T. Schröder (1987). "The effect of fat-rich diet and chronic ethanol ingestion on ascitic fluid and plasma enzyme activities in acute pancreatitis in rats." *Acta Chir Scand* 153(3): 203-7.
- Ramudo, L., M. A. Manso and I. de Dios (2005). "Biliary pancreatitis-associated ascitic fluid activates the production of tumor necrosis factor-alpha in acinar cells." *Crit Care Med* 33: 143-48.

- Ranson, J. H. and F. C. Spencer (1978). "The role of peritoneal lavage in severe acute pancreatitis." *Ann Surg* 187(5): 565-75.
- Rau, B., B. Poch, F. Gansauge, A. Bauer, A. K. Nussler, T. Nevalainen, M. H. Schoenberg and H. G. Beger (2000). "Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage?" *Ann Surg* 231(3): 352-60.
- Reaven, G. M. (1995). "Pathophysiology of insulin resistance in human disease." *Physiol Rev* 75(3): 473-86.
- Redinger, R. N. (2008). "The physiology of adiposity." *J Ky Med Assoc* 106(2): 53-62.
- Reed, A. M., S. Z. Husain, E. Thrower, M. Alexandre, A. Shah, F. S. Gorelick and M. H. Nathanson (2011). "Low extracellular pH induces damage in the pancreatic acinar cell by enhancing calcium signaling." *J Biol Chem* 286(3): 1919-26.
- Reeder, B. J., D. A. Svistunenko, C. E. Cooper and M. T. Wilson (2004). "The radical and redox chemistry of myoglobin and hemoglobin: from in vitro studies to human pathology." *Antioxid Redox Signal* 6(6): 954-66.
- Richman, P. and A. Meister (1975). "Regulation of g-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feed back inhibition by glutathione." *J. Biol. Chem.* 250: 1422-1426.
- Rinderknecht, H. (1988). "Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation?" *Int J Pancreatol* 3(2-3): 105-12.
- Robertson, C. S., G. S. Basran and J. G. Hardy (1988). "Lung vascular permeability in patients with acute pancreatitis." *Pancreas* 3(2): 162-5.
- Rock, C. L., R. A. Jacob and P. E. Bowen (1996). "Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids." *J Am Diet Assoc* 96(7): 693-702; quiz 703-4.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2001). "PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth." *J Biol Chem* 276(41): 37731-4.
- Rother, R. P., L. Bell, P. Hillmen and M. T. Gladwin (2005). "The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease." *JAMA* 293(13): 1653-62.
- Ruan, H., N. Hacoheh, T. R. Golub, L. Van Parijs and H. F. Lodish (2002). "Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory." *Diabetes* 51(5): 1319-36.
- Rubinfeld, G. D., E. Caldwell, E. Peabody, J. Weaver, D. P. Martin, M. Neff, E. J. Stern, and L. D. Hudson (2005). "Incidence and outcomes of acute lung injury." *N Engl J Med* 353(16): 1685-93.
- Sah, R. P., P. Garg and A. K. Saluja (2012). "Pathogenic mechanisms of acute pancreatitis." *Curr Opin Gastroenterol* 28(5): 507-15.
- Saldeen, J. (2000). "Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells." *Endocrinology* 141(6): 2003-10.
- Salomone, T., P. Tosi, N. Di Battista, N. Binetti, C. Raiti, P. Tomassetti, M. Migliori and L. Gullo (2002). "Impaired alveolar gas exchange in acute pancreatitis." *Dig Dis Sci* 47(9): 2025-8.
- Saluja, A., M. Saluja, A. Villa, U. Leli, P. Rutledge, J. Meldolesi and M. Steer (1989). "Pancreatic duct obstruction in rabbits causes digestive zymogen and lysosomal enzyme colocalization." *J Clin Invest* 84(4): 1260-6.
- Saluja, A. K. and M. L. P. Steer (1999). "Pathophysiology of pancreatitis. Role of cytokines and other mediators of inflammation." *Digestion* 60 Suppl 1: 27-33.

- Sanfey, H., G. B. Bulkley and J. L. Cameron (1984). "The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis." *Ann Surg* 200(4): 405-13.
- Sanfey, H., G. B. Bulkley and J. L. Cameron (1985). "The pathogenesis of acute pancreatitis. The source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models." *Ann Surg* 201(5): 633-9.
- Sadr-Azodi, O., N. Orsini, Å. Andrén-Sandberg and A. Wolk (2013). "Abdominal and total adiposity and the risk of acute pancreatitis: a population-based prospective cohort study." *Am J Gastroenterol* 108(1): 133-9.
- Samuel, I., L. Tephly, D. E. Williard and A. B. Carter (2008). "Enteral exclusion increases MAP kinase activation and cytokine production in a model of gallstone pancreatitis." *Pancreatology* 8: 6-14.
- Sastre, J., N. Asensi, E. Gascó, F. V. Pallardó, J. A. Ferrero, T. Furukawa and J. Viña (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: Prevention by antioxidant administration." *Am. J. Physiol.* 32: R992-R995.
- Satake, K., I. Koh, H. Nishiwaki and K. Umeyama (1985). "Toxic products in hemorrhagic ascitic fluid generated during experimental acute hemorrhagic pancreatitis in dogs and a treatment which reduces their effect." *Digestion* 32(2): 99-105.
- Satoh, A., T. Shimosegawa, A. Masamune, M. Fujita, M. Koizumi and T. Toyota (1999). "Ascitic fluid of experimental severe acute pancreatitis modulates the function of peritoneal macrophages." *Pancreas* 19: 268-75.
- Satoh, K., T. Shimosegawa, A. Masamune, M. Hirota, K. Kikuta, Y. Kihara, S. Kuriyama, I. Tsuji, A. Satoh and S. Hamada; Research Committee of Intractable Diseases of the Pancreas (2011). "Nationwide epidemiological survey of acute pancreatitis in Japan." *Pancreas* 40(4): 503-7.
- Scarpellini, E. and J. Tack (2012). "Obesity and metabolic syndrome: an inflammatory condition." *Dig Dis* 30(2): 148-53.
- Schaer, D. J., P. W. Buehler, A. I. Alayash, J. D. Belcher and G. M. Vercellotti (2013). "Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins." *Blood* 121(8): 1276-84.
- Schnekenburger, J., J. Mayerle, B. Kruger, I. Buchwalow, F. U. Weiss, E. Albrecht, V. E. Samoiloova, W. Domschke and M. M. Lerch (2005). "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: 1445-55.
- Schönenberg, M. H., M. Buchler, K. Baczako, B. Bultmann, M. Younes, M. Gasper, R. Kirchmayr and H. G. Beger (1991). "The involvement of oxygen radicals in acute pancreatitis." *Klin Wochenschr* 69(21-23): 1025-31.
- Schölmerich, J., A. Heinisch and H. G. Leser (1993). "Diagnostic approach to acute pancreatitis: diagnosis, assessment of etiology and prognosis." *Hepatogastroenterology* 40(6): 531-7.
- Schröder, N. W., B. Opitz, N. Lamping, K. S. Michelsen, U. Zähringer, U. B. Göbel and R. R. Schumann (2000). "Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema glycolipids*." *J Immunol* 165(5): 2683-93.
- Schulz, H. U., C. Niederau, H. Klonowski-Stumpe, W. Halang, R. Luthen and H. Lippert (1999). "Oxidative stress in acute pancreatitis." *Hepatogastroenterology* 46(29): 2736-50.
- Segersvärd, R., M. Sylván, M. Herrington, J. Larsson and J. Permert (2001). "Obesity increases the severity of acute experimental pancreatitis in the rat." *Scand J Gastroenterol* 36: 658-63.
- Segersvärd, R., J. A. Tsai, M. K. Herrington and F. Wang (2008). "Obesity alters cytokine gene expression and promotes liver injury in rats with acute pancreatitis." *Obesity* 16: 23-8.

- Semenza, G. L. and G. L. Wang (1992). "A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation." *Mol Cell Biol* 12(12): 5447-54.
- Semenza, G. L. (2004). "O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1." *J Appl Physiol* 96(3): 1173-7.
- Sempere, L., J. Martinez, E. de Madaria, B. Lozano, J. Sanchez-Paya, R. Jover and M. Pérez-Mateo (2008). "Obesity and fat distribution imply a greater systemic inflammatory response and a worse prognosis in acute pancreatitis." *Pancreatology* 8(3): 257-64.
- Sendler, M., A. Dummer, F. U. Weiss, B. Krüger, T. Wartmann, K. Scharffetter-Kochanek, N. van Rooijen, S. R. Malla, A. Aghdassi, W. Halangk, M. M. Lerch and J. Mayerle (2013). "Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice." *Gut* 62(3) :430-9.
- Senello, J. A., R. Fayad, M. Pini, M. E. Gove, V. Ponemone, R. J. Cabay, B. Siegmund, C. A. Dinarello and G. Fantuzzi (2008). "Interleukin-18, together with interleukin-12, induces severe acute pancreatitis in obese but not in nonobese leptin-deficient mice." *PNAS* 105: 8085–90.
- Sevillano, S., A. M. de la Mano, M. A. Manso, A. Orfao and I. de Dios (2003). "N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis." *Biochim Biophys Acta* 1639(3): 177-84.
- Sharer, N., P. Scott, D. Deardon, S. Lee, P. Taylor and J. Braganza (1995). "Clinical trial of 24 hours treatment with glutathione precursors in acute pancreatitis." *Clin Drug Invest* 10: 147-157.
- Shen, H. N., C. L. Lu and C. Y. Li (2012). "Epidemiology of first-attack acute pancreatitis in Taiwan from 2000 through 2009: a nationwide population-based study." *Pancreas* 41(5): 696-702.
- Shinozaki, S., C. S. Choi, N. Shimizu, M. Yamada, M. Kim, T. Zhang, G. Shiota, H. H. Dong, Y. B. Kim and M. Kaneki (2011). "Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice." *J Biol Chem* 286(40): 34959-75.
- Sies, H. (1986). "Biochemistry of oxidative stress." *Angewandte Chem.* 25: 1058-1071.
- Simões, R. L., M. A. Arruda, C. Canetti, C. H. Serezani, I. M. Fierro and C. Barja-Fidalgo (2013). "Proinflammatory responses of heme in alveolar macrophages: repercussion in lung hemorrhagic episodes." *Mediators Inflamm* 2013: 946878.
- Sims, E.A., E. Danforth, E. S. Horton, G. A. Bray, J. A. Glennon and L. B. Salans (1973). "Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man." *Recent Prog Horm Res* 29: 457-96.
- Singh, V. K. , T. L. Bollen, B. U. Wu, K. Repas, R. Maurer, S. Yu, K. J. Morteale, D. L. Conwell and P. A. Banks (2011). "An assessment of the severity of interstitial pancreatitis." *Clin Gastroenterol Hepatol* 9(12): 1098-103.
- Slater, T. F. (1984). "Free radical mechanism in tissue injury." *Biochem. J.* 222: 1-15.
- Slatter, D. A., C. H. Bolton and A. J. Bailey (2000). "The importance of lipid derived malondialdehyde in diabetes mellitus." *Diabetologia* 43: 550-57.
- Sonna, L. A., M. L. Cullivan, H. K. Sheldon, R. E. Pratt and C. M. Lilly (2003). "Effect of hypoxia on gene expression by human hepatocytes (HepG2)." *Physiol Genomics* 12(3): 195-207.
- Souza, L. J., A. M. Coelho, S. N. Sampietre, J. O. Martins, J. E. Cunha and M. C. Machado (2010). "Anti-inflammatory effects of peritoneal lavage in acute pancreatitis." *Pancreas* 39(8): 1180-4.
- Spanier, B. W., Y. Nio, R. W. van der Hulst, H. A. Tuynman, M. G. Dijkgraaf and M.J. Bruno (2010). "Practice and yield of early CT scan in acute pancreatitis: a Dutch Observational Multicenter Study." *Pancreatology* 10(2-3): 222-8.

- Srinivasan, S. and N. G. Avadhani (2012). "Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress." *Free Radic Biol Med* 53(6):1252-63.
- Steer, M. (2002). "Pancreatitis severity: who calls the shots?" *Gastroenterology* 122(4): 1168-72.
- Stevens, J., D. Couper, J. Pankow, A. R. Folsom, B. B. Duncan, F. J. Nieto, D. Jones and H. A. Tyroler (2001). "Sensitivity and specificity of anthropometrics for the prediction of diabetes in a biracial cohort." *Obes Res* 9(11): 696-705.
- Strissel, K. J., Z. Stancheva, H. Miyoshi, J. W. 2nd Perfield, J. DeFuria, Z. Jick, A. S. Greenberg and M. S. Obin (2007). "Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications." *Diabetes* 56(12) :2910-8.
- Strowig, T., J. Henao-Mejia, E. Elinav and R. Flavell (2012). "Inflammasomes in health and disease." *Nature* 481(7381): 278-86.
- Subramanian, K., R. Du, N. S. Tan, B. Ho and J. L. Ding (2013). "CD163 and IgG codefend against cytotoxic hemoglobin via autocrine and paracrine mechanisms." *J Immunol* 190(10): 5267-78.
- Sun, G. Y., Q. H. Shi and Y. Sun (2004). "Novel biporous polymeric stationary phase for high-speed protein chromatography." *J Chromatogr A* 1061(2): 159-65.
- Sun, G. and A. F. Palmer (2008). "Preparation of ultrapure bovine and human hemoglobin by anion exchange chromatography." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 867(1): 1-7.
- Sung, Y. H., M. S. Shin, I. G. Ko, S. E. Kim, C. J. Kim, H. J. Ahn, H. S. Yoon and B. J. Lee (2013). "Ulinastatin suppresses lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 synthesis and nitric oxide production through the downregulation of nuclear factor- κ B in BV2 mouse microglial cells." *Int J Mol Med* 31(5): 1030-6.
- Surmi, B. K. and A. H. Hasty (2008). "Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling." *Future Lipidol* 3(5): 545-556.
- Szczesny, B., K. K. Bhakat, S. Mitra and I. Boldogh (2004). "Age-dependent modulation of DNA repair enzymes by covalent modification and subcellular distribution." *Mech Ageing Dev* 2125(10-11): 755-65.
- Takacs, P., S. W. Kauma, M. M. Sholley, S. W. Walsh, M. J. Dinsmoor and K. Green (2001). "Increased circulating lipid peroxides in severe preeclampsia activate NF- κ B and upregulate ICAM-1 in vascular endothelial cells." *FASEB J* 15:279-81.
- Takahashi, K., T. M. Nammour, M. Fukunaga, J. Ebert, J. D. Morrow, L. J. Roberts II, R. L. Hoover and K. F. Badr (1992). "Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors." *J Clin Invest* 90: 136-41.
- Tanjoh, K., R. Tomita, T. Izumi, K. Kinoshita, Y. Kawahara, T. Moriya and A. Utagawa (2007). "The expression of the inducible nitric oxide synthase messenger RNA on monocytes in severe acute pancreatitis." *Hepatogastroenterology* 54(75): 927-31.
- Tateishi, N., T. Higashi, S. Shinya, A. Naruse and Y. Sakamoto (1974). "Studies of the regulation of glutathione level in rat liver." *J. Biochem.* 75: 90-103.
- Tateishi, N., H. Shiozaki, K. Nakashima, A. Naruse and T. Higashi (1977). "Rat liver glutathione: Possible role as reservoir of cysteine." *J. Nutr.* 107: 51-58.
- Tateishi, N. and Y. Sakamoto (1983). Nutritional significance of glutathione in rat liver. *Glutathione storage, transport and turnover in mammals*. Y. Sakamoto. Tokyo, Scientific Soxoetu Press: 13-38.
- Tauler, J. and J. L. Mulshine (2009). "Lung cancer and inflammation: interaction of chemokines and hnRNPs." *Curr Opin Pharmacol* 9(4): 384-8.

- Telek, G., J. Y. Scoazec, J. Chariot, R. Ducroc, G. Feldmann and C. Roz (1999). "Cerium-based histochemical demonstration of oxidative stress in taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. A confocal laser scanning microscopic study." *J Histochem Cytochem* 47(9): 1201-12.
- Telek, G., J. Regoly-Merei, G. C. Kovacs, L. Simon, Z. Nagy, J. Hamar and F. Jakab (2001). "The first histological demonstration of pancreatic oxidative stress in human acute pancreatitis." *Hepatogastroenterology* 48(41): 1252-8.
- Thandassery, R. B., T. D. Yadav, U. Dutta, S. Appasani, K. Singh and R. Kochhar (2013). "Dynamic nature of organ failure in severe acute pancreatitis: the impact of persistent and deteriorating organ failure." *HPB (Oxford)* 15(7): 523-8.
- Thurston, G., C. Suri, K. Smith, J. McClain, T. N. Sato, G. D. Yancopoulos and D. M. McDonald (1999). "Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiotensin-1." *Science* 286(5449): 2511-4.
- Tilquin, B. M., T. C. O'Connor, C. M. Hancotte-La Haye, D. M. Gonze, M. S. Reynaert, C. G. De Muylder and P. J. Kestens (1990). "The effect of peritoneal dialysis with and without aprotinin on acute experimental pancreatitis in rats." *Int Surg* 75(3): 174-8.
- Tonks, N.K. (2005). "Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling." *Cell* 121: 667-670.
- Toskes, P. P. (1990). "Hyperlipidemic pancreatitis." *Gastroenterol Clin North Am* 19: 783-91.
- Toth, P. P. (2013). "Insulin Resistance, Small LDL Particles, and Risk for Atherosclerotic Disease." *Curr Vasc Pharmacol*
- Tsuji, N., N. Watanabe, T. Okamoto and Y. Niitsu (1994). "Specific interaction of pancreatic elastase and leucocytes to produce oxygen radicals and its implication in pancreatitis." *Gut* 35(11): 1659-64.
- Tsukahara, Y., Y. Horita, K. Anan, T. Morisaki, M. Tanaka and M. Torisu (1996). "Role of nitric oxide derived from alveolar macrophages in the early phase of acute pancreatitis." *J Surg Res* 66(1): 43-50.
- Uchida K. (2000). "Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases." *Free Radic Biol Med* 28: 1685-96.
- Uhl, W., A. Warshaw, C. Imrie, C. Bassi, C. J. McKay, P. G. Lankisch, R. Carter, E. Di Magno, P. A. Banks, D. C. Whitcomb, C. Dervenis, C. D. Ulrich, K. Satake, P. Ghaneh, W. Hartwig, J. Werner, G. McEntee, J. P. Neoptolemos and M. W. Buchler (2002). "IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis." *Pancreatology* 2(6): 565-73.
- Van der Veen, L. A., M. F. Hashim, Y. Shyr and L. J. Marnett (2003). "Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde." *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14247-52.
- Van Hee, R., F. Van Elst, F. Van Rooy, R. Van Haasen and A. Hubens (1981). "Peritoneal lavage in acute pancreatitis. An experimental and clinical study." *Acta Chir Belg* 80(6): 397-402.
- Vaquero, E., I. Gukovsky, V. Zaninovic, A. S. Gukovskaya and S. J. Pandol (2001). "Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(6): G1197-208.
- Vege, S. S., T. B. Gardner, S. T. Chari, P. Munukuti, R. K. Pearson, J. E. Clain, B. T. Petersen, T. H. Baron, M. B. Farnell and M. G. Sarr (2009). "Low mortality and high morbidity in severe acute pancreatitis without organ failure: a case for revising the Atlanta classification to include "moderately severe acute pancreatitis"." *Am J Gastroenterol* 104(3): 710-5.
- Vergeade, A., P. Mulder, C. Vendeville, R. Ventura-Clapier, C. Thuillez and C. Monteil (2012). "Xanthine oxidase contributes to mitochondrial ROS generation in an experimental model of cocaine-induced diastolic dysfunction." *J Cardiovasc Pharmacol* 60(6):538-43.

- Vincent, J. L., R. Moreno, J. Takala, S. Willatts, A. De Mendonça, H. Bruining, C. K. Reinhart, P. M. Suter and L. G. Thijs (1996). "The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine." *Intensive Care Med* 22(7): 707-10.
- Viña, J., R. Hems and H. A. Krebs (1978). "Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes." *Biochemical Journal* 170(3): 627-630.
- Viña, J., E. Gascó, F. V. Pallardó, J. Sastre, J. M. Estrela and F. Rodrigo (1990). Effect of physiological changes in cystathionase activity on aminoacid and glutathione metabolism in rat fetus. *Endocrine and biochemical development of the fetus and neonate*. J. M. Cuezva and A. M. Pascual-Leone. Nueva York., Editorial Plenum Press: 283-286.
- Viña, J., A. Gimenez, I. R. Puertes, E. Gasco and J. R. Vina (1992). "Impairment of cysteine synthesis from methionine in rats exposed to surgical stress." *Br J Nutr* 68(2): 421-9.
- Viña, J. R., F. V. Pallardo, C. García, A. Triguero, J. A. Martín, J. Boix, A. Pellín, J. Viña and J. Sastre (1996). Metabolic implications of beta-cystathionase activity in mammals. *Methionine metabolism. Molecular mechanism and clinical implications*. J. M. Mato and A. Caballero. Madrid, CSIC, Jarpyo Editores: 111-120.
- Viterbo, D., M. H. Bluth, C. M. Mueller and M. E. Zenilman (2008). "Mutational characterization of pancreatitis-associated protein 2 domains involved in mediating cytokine secretion in macrophages and the NF-kappaB pathway." *J Immunol* 181(3): 1959-68.
- Vladimirov, Y. A. (1986). Free radical lipids peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation and biological consequences. *Free radicals, aging and degenerative diseases*. J. E. Johnson, R. Walford, J. Harman, J. Miquel and A. R. Liss: 141-195.
- Voitkun, V. and A. Zhitkovich (1999). "Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro." *Mutat Res* 424: 97-106.
- Vollmar, B., H. Waldner, M. Vierl, T. Kerner, P. Lehnert and L. Schweiberer (1992). "Hemodynamic effects following intraperitoneal infusion of pancreatic ascites fluid." *Res Exp Med (Berl)* 192(4): 269-79.
- von Sonntag, C. (1994). "Radiation chemistry in the 1990s: pressing questions relating to the areas of radiation biology and environmental research." *Int J Radiat Biol* 65(1): 19-26.
- Vona-Davis, L. and D. P. Rose (2007). "Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression." *Endocr Relat Cancer* 14(2): 189-206.
- Voronina, S. G., S. L. Barrow, A. W. Simpson, O. V. Gerasimenko, G. da Silva Xavier, G. A. Rutter, O. H. Petersen and A. V. Tepikin (2010). "Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells." *Gastroenterology* 138(5): 1976-87.
- Wall, A. J. (1965). "Peritoneal dialysis in the treatment of severe acute pancreatitis." *Med J Aust* 2(7): 281-3.
- Wang, B., P. Zhang and Q. Wei (2008). "Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases." *Sci China C Life Sci* 51: 487-94.
- Wang, Y., L. Sternfeld, F. Yang, J. A. Rodriguez, C. Ross, M. R. Hayden, F. Carriere, G. Liu, W. Hofer and I. Schulz (2009). "Enhanced susceptibility to pancreatitis in severe hypertriglyceridaemic lipoprotein lipase-deficient mice and agonist-like function of pancreatic lipase in pancreatic cells." *Gut* 58: 422-30.
- Warshaw, A. L., P. B. Lesser, M. Rie and D. J. Cullen (1975). "The pathogenesis of pulmonary edema in acute pancreatitis." *Ann Surg* 182(4): 505-10.
- Watanabe, O., F. M. Baccino, M. L. Steer and J. Meldolesi (1984). "Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis." *Am J Physiol* 246(4 Pt 1): G457-67.

- Weaver, J.U. (2008). "Classical endocrine diseases causing obesity." *Front Horm Res* 36: 212-28
- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Jr Ferrante (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest* 112(12): 1796-808.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2003). "Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue" *J Clin Invest* 112(12): 1785-8.
- Wenhong, D., Y. Jia, W. Weixing, C. Xiaoyan, C. Chen, X. Sheng and J. Hao (2012). "Zerumbone attenuates the severity of acute necrotizing pancreatitis and pancreatitis-induced hepatic injury." *Mediators Inflamm* 2012: 156507.
- Whitcomb, D. C. (1999). "Early trypsinogen activation in acute pancreatitis." *Gastroenterology* 116(3): 770-2.
- Willemer, S., C. O. Feddersen, W. Karges and G. Adler (1991). "Lung injury in acute experimental pancreatitis in rats. I. Morphological studies." *Int J Pancreatol* 8(4): 305-21.
- Winterbourn, C. C., M. J. Bonham, H. Buss, F. M. Abu-Zidan and J. A. Windsor (2003). "Elevated protein carbonyls as plasma markers of oxidative stress in acute pancreatitis." *Pancreatology* 3(5): 375-82.
- Wolf, H. K., J. Tuomilehto, K. Kuulasmaa, S. Domarkiene, Z. Cepaitis, A. Molarius, S. Sans, A. Dobson, U. Keil and S. Rywik (1997). "Blood pressure levels in the 41 populations of the WHO MONICA Project." *J Hum Hypertens* 11(11): 733-42.
- Wong, S. H. Y., J. A. Knight, S. M. Hopfer, O. Zaharia, C. N. Leach and F. W. J. Sunderma (1987). "Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct." *Clin Chem* 33: 214-20.
- Wun, T. (2001). "The Role of Inflammation and Leukocytes in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease; Haemoglobinopathy." *Hematology* 5(5): 403-412.
- Xu, Y. and T. L. Krukoff (2007). "Adrenomedullin stimulates nitric oxide production from primary rat hypothalamic neurons: roles of calcium and phosphatases." *Mol Pharmacol* 72: 112-20.
- Yadav, D., N. Agarwala and C. S. Pitchumoni (2002). "A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis." *Am J Gastroenterol* 97(6): 1309-18.
- Yadav, D. and D. C. Whitcomb (2010). "The role of alcohol and smoking in pancreatitis." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7(3):131-45.
- Yadav, D. and A. B. Lowenfels (2013). "The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer." *Gastroenterology* 144(6): 1252-61.
- Yan, L., V. A. Lavin, L. R. Moser, Q. Cui, C. Kanies and E. Yang (2008). "PP2A regulates the proapoptotic activity of FOXO1." *J Biol Chem* 283: 7411-20.
- Yang, A. L., S. Vadhavkar, G. Singh and M.B. Omary (2008). "Epidemiology of alcohol-related liver and pancreatic disease in the United States." *Arch Intern Med* 168(6): 649-56.
- Yegneswaran, B., J. B. Kostis and C. S. Pitchumoni (2011). "Cardiovascular manifestations of acute pancreatitis." *J Crit Care* 26(2): 225.e11-8.
- Yu, J. H., J. W. Lim, K. H. Kim, T. Morio and H. Kim (2005). "NADPH oxidase and apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar AR42J cells." *Free Radic Biol Med* 39: 590-602.
- Zamoyska, R. (2007). "Why is there so much CD45 on T cells?" *Immunity* 27: 421-23.
- Zhang, X. P., L. Wang and Y. F. Zhou (2008). "The pathogenic mechanism of severe acute pancreatitis complicated with renal injury: a review of current knowledge." *Dig Dis Sci* 53: 297-306.

Zhang, Y., Y. Qui, J. Zhu and D. Gao (2007). "Pulmonary hypertension associated with autoimmune hemolytic anemia: a case report." *Int J Cardiol* 115(1): e1-2.

Zhang, Z., D. R. Blake, C. R. Stevens, J. M. Kanczler, P. G. Winyard, M. C. Symons, M. Benboubetra and R. Harrison (1998). "A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: the role of NADH as an electron donor." *Free Radic Res* 28(2): 151-64.

Zheng, Y., M. Humphry, J. J. Maguire, M. R. Bennett and M. C. Clarke (2013). "Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 α , controlling necrosis-induced sterile inflammation." *Immunity* 38(2): 285-95.

Zhou, R., A. S. Yazdi, P. Menu and J. Tschopp (2011). "A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation." *Nature* 469(7329): 221-5.

Zhou, W., B. A. Levine and M. S. Olson (1993). "Platelet-activating factor: a mediator of pancreatic inflammation during cerulein hyperstimulation." *Am J Pathol* 142(5): 1504-12.

Zyromski, N. J., A. Mathur, H. A. Pitt, D. Lu, J. T. Gripe, J. J. Walker, K. Yancey, T. E. Wade and D. A. Swartz-Basile (2008). "A murine model of obesity implicates the adipokine milieu in the pathogenesis of severe acute pancreatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295(3): G552-8.