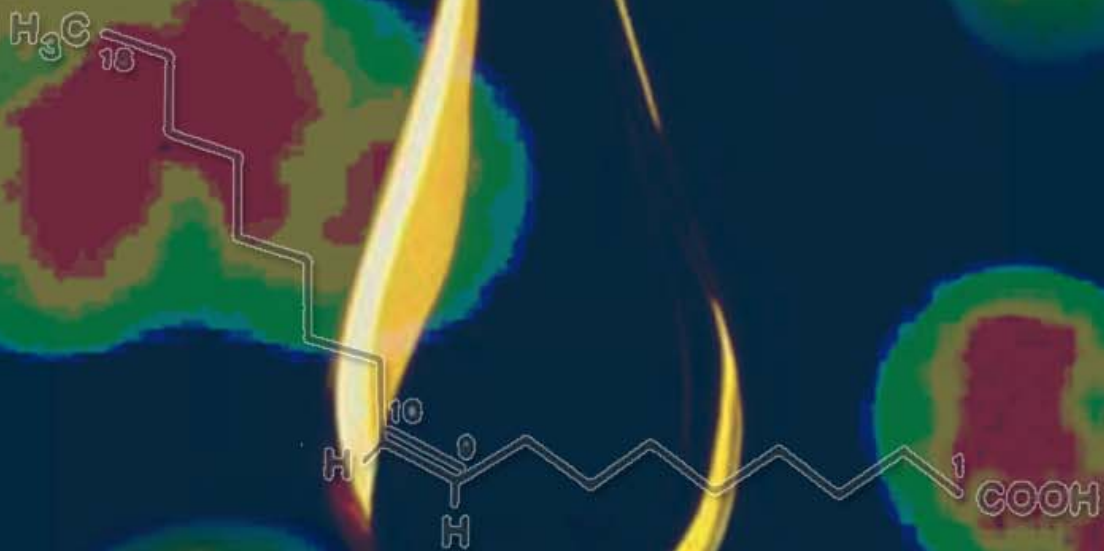


# TESIS DOCTORAL

Desarrollo en células AR42J de un modelo *in vitro* de modificación del perfil lipídico de membrana de células acinares pancreáticas mediante cambios en la grasa de la dieta. Validación funcional y respuesta a estímulos nocivos.



*Nama 'a Audi Al-Amiry*



ugr | Universidad  
de Granada





**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**  
**INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS**  
**ALIMENTOS**



**TESIS DOCTORAL**

**DESARROLLO EN CÉLULAS AR42J DE UN MODELO *IN VITRO***  
**DE MODIFICACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO DE MEMBRANA DE**  
**CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS MEDIANTE CAMBIOS**  
**EN LA GRASA DE LA DIETA. VALIDACIÓN FUNCIONAL Y**  
**RESPUESTA A ESTÍMULOS NOCIVOS**

**Nama´a Audi Al-Amiry**

**2008**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Nama'a Audi Al-Amiry  
D.L.: GR.1614-2008  
ISBN: 978-84-691-4852-5



D. Mariano Mañas Almendros, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Granada.  
D. Emilio Martínez de Victoria Muñoz, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Granada.  
D<sup>a</sup> María Dolores Yago Torregrosa, Profesora Contratada Doctora por la Universidad de Granada.

**CERTIFICAN:**

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: “**Desarrollo en células AR42J de un modelo *in vitro* de modificación del perfil lipídico de membrana de células acinares pancreáticas mediante cambios en la grasa de la dieta. Validación funcional y respuesta a estímulos nocivos**”, han sido realizados bajo nuestra dirección por la licenciada Nama’a Audi Al-Amiry y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de “Doctor Europeo” por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a nueve de Mayo de dos mil ocho.





MEMORIA QUE PRESENTA LA LDA. EN FARMACIA  
NAMA´A AUDI AL-AMIRY PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTORA POR LA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Esta tesis doctoral ha sido realizada bajo la dirección de:

Prof. Dr.  
D. Mariano Mañas Almendros

Prof. Dr.  
D. Emilio Martínez de Victoria  
Muñoz

Prof. Dra.  
D<sup>a</sup> María Dolores Yago Torregrosa

Lda. Nama´a Audi Al-Amiry  
Granada, 2008





**ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN HA SIDO LLEVADO A CABO GRACIAS A LA SIGUIENTE FINANCIACIÓN:**

**Título del Proyecto:** Modificación de los lípidos de membrana por la grasa dietética en células acinares pancreáticas. Estudio de mecanismos de señalización intracelular y secretoras frente a distintos estímulos.

**Investigador Principal:** Mariano Mañas Almendros

**Entidad Financiadora:** MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CIENCIA

**Título del Proyecto:** Mecanismos celulares y moleculares del daño celular temprano inducido por ácidos biliares y etanol en células acinares pancreáticas. Modulación por cambios en el perfil lipídico de las membranas.

**Investigador Principal:** Maria Dolores Yago Torregrosa

**Entidad Financiadora:** UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Título del Proyecto:** Estudio del efecto beneficioso de ingredientes funcionales de la dieta mediterránea (ácidos grasos, compuestos fenólicos) sobre procesos oxidativo-inflamatorios en un modelo *in vitro* de pancreatitis aguda.

**Investigador Principal:** Emilio Martínez de Victoria Muñoz

**Entidad Financiadora:** MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CIENCIA

Asimismo, durante la realización de esta Tesis Doctoral la Doctoranda ha disfrutado de una beca/contrato del Programa de Formación de Doctores (2004-2008), así como de un Incentivo para una estancia de tres meses de duración en el *Institute of Molecular Biology & Physiology* (Universidad de Copenhague, Dinamarca) concedidas por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía.



## **PUBLICACIONES BASADAS EN ESTA TESIS DOCTORAL:**

**Audi N**, Mesa MD, Martínez MA, Martínez-Victoria E, Mañas M, Yago MD. Membrane lipid composition of pancreatic AR42J cells: modification by exposure to different fatty acids. *Exp Biol Med (Maywood)*, 232:532-41, 2007.

**Audi N**, Mesa MD, Martínez MA, Martínez-Victoria E, Mañas M, Yago MD. Differentiation of AR42J cells: effects on adaptation of membrane lipidic profile and amylase secretion. *Acta Physiol*, 190, suppl. 655:P86, 2007.

**Audi N**, Martínez MA, Mesa MD, Martínez-Victoria E, Mañas M, Yago MD. Interleukin-6 effects on amylase secretion and calcium signalling in pancreatic AR42J cells: modulation by membrane fatty acid composition. *Proc Nutr Soc.*67, 2008. (*in press*)

**Audi N**, Mesa MD, Santana C, López-Millán MB, Martínez-Burgos MA, Mañas M, Martínez-Victoria E, Yago MD. Effects of dexamethasone and exposure period to different fatty acids in the culture medium on adaptation of membrane lipid profile and amylase secretion. (En preparación).

**Audi N**, Santana C, López-Millán MB, Martínez-Burgos MA, Martínez-Victoria E, Mañas M, Yago MD. Interleukin-6 effects on amylase secretion and calcium signalling in pancreatic AR42J cells: modulation by membrane fatty acid composition. (En preparación).

**Audi N**, López-Millán MB, Santana C, Martínez-Burgos MA, Mañas M, Martínez-Victoria E, Yago MD. Mechanisms involved with the early stages of acinar cell injury induced by bile acids in AR42J pancreatic acinar cells. Modulation by changes in membrane fatty acids. (En preparación).



Con el objetivo de acceder a la mención de “**Doctorado Europeo**” parte de esta tesis está en castellano y parte en inglés.

En lengua inglesa se pueden encontrar:

- El artículo completo: Membrane lipid composition of pancreatic AR42J cells: modification by exposure to different fatty acids. *Exp Biol Med (Maywood)*, 232:532-41, 2007.
- La introducción del artículo: Effects of dexamethasone and exposure period to different fatty acids in the culture medium on adaptation of membrane lipid profile and amylase secretion. (En preparación).
- La introducción del artículo: Interleukin-6 effects on amylase secretion and calcium signalling in pancreatic AR42J cells: modulation by membrane fatty acid composition. (En preparación).
- La introducción del artículo: Mechanisms involved with the early stages of acinar cell injury induced by bile acids in AR42J pancreatic acinar cells. Modulation by changes in membrane fatty acids. (En preparación).
- Resumen de la tesis
- Conclusiones

In order to be awarded with the **European Doctorate** accreditation, the condition has to be met that parts of the doctoral thesis, at least the summary and the conclusions, are written in an official language of a European country, other than Spanish. According to these criteria, the following parts are in English language:

- Full article: Membrane lipid composition of pancreatic AR42J cells: modification by exposure to different fatty acids. *Exp Biol Med (Maywood)*, 232:532-41, 2007.
- Introduction of a manuscript: Effects of dexamethasone and exposure period to different fatty acids in the culture medium on adaptation of membrane lipid profile and amylase secretion. (In preparation).
- Introduction of a manuscript: Interleukin-6 effects on amylase secretion and calcium signalling in pancreatic AR42J cells: modulation by membrane fatty acid composition. (In preparation).
- Introduction of a manuscript: Mechanisms involved with the early stages of acinar cell injury induced by bile acids in AR42J pancreatic acinar cells. Modulation by changes in membrane fatty acids. (In preparation).
- Summary of the thesis
- Conclusions

## **Agradecimientos**

*En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, Emilio, Mariano y Dolo, por la oportunidad que me habéis dado y, porque desde el principio me habéis hecho sentir como parte de un equipo. Gracias por vuestro trato humano y cercano, por vuestra buena disponibilidad, vuestra dedicación, y por poder contar con vosotros en cualquier momento. Gracias por darme la posibilidad de superarme cada día, por haber creído en mí y por animarme constantemente. A Emilio, por tus consejos, y por ser un modelo a seguir de equilibrio, paciencia y tolerancia. A Mariano, por aportarme siempre una visión positiva y optimista (aunque tú la llares realista) que me ayuda a seguir intentándolo cuando las cosas no salen bien. A Dolo, simplemente por ser como eres, admirable, por poder contar contigo para todo, por haber sido mi gran apoyo en el INYTA, porque has sido como una hermana mayor, exigente y, al mismo tiempo, entregada y comprensiva. Muchas gracias a los tres; como he dicho siempre: “me ha tocado la lotería con mis jefes”. Habéis puesto el listón muy alto, tanto en lo profesional como en lo personal; espero haber estado a la altura.*

*También me gustaría agradecer a Alba, porque contigo he compartido mucho más que el laboratorio, por los congresos de los que hemos disfrutado juntas tanto dentro como fuera de Granada, y por lo bien que nos complementamos al dar prácticas y lo sincronizadas que vamos.*

*Gracias a los amigos y compañeros del “café”: Puri (por los buenos momentos compartidos), Jesús (por tu predisposición a ayudar siempre), M.D. (por lo que me has enseñado), Josune, Chiqui, Julio, Sergio, Laura, Pepe, Mayca, Ignacio (por tu ayuda con el ordenador), Susana (por tu ayuda técnica), Mari Cruz y Alicia. Gracias por lo que he aprendido en el día a día con todos vosotros y por vuestro compañerismo. A los que estáis en la última fase de vuestra tesis, ¡MUCHO ÁNIMO!*

*Quiero hacer una mención especial a Belén, Carola y Pedro, por vuestro apoyo constante en la última fase de mi tesis, por lo que me habéis aportado tanto en lo profesional (que no ha sido poco) como en lo personal, por escucharme, entenderme y animarme cada día.*

*Gracias también a “los de la planta de arriba”, sobre todo a Cristina y Javi por los ánimos, gracias Javi por el diseño de la portada y separadores de esta tesis.*

*No me olvido de agradecer a los que ya no estáis en el INYTA, aquellos con los que empecé aquí y que me habéis aportado tanto: José Ramón, Ricardo, Javi Linde, Yoli y otros tantos. Gracias Luz por tu amistad sincera. Gracias también a las nuevas incorporaciones al instituto por vuestra sonrisa matutina.*

*Gracias a los profesores Dr. Miguel Moreno Prieto y a la Dra. María López-Jurado, antiguo y nueva directores del Departamento de Fisiología, por vuestra buena disposición. Gracias al resto de compañeros del Departamento por acogerme tan bien.*

*Gracias al personal de administración y servicios del INYTA y del Departamento, tanto los que estáis fijos como los que habéis pasado cortas temporadas con nosotros: Concha, Elisa, Sensi, Isa, Lili, M<sup>a</sup> Luisa, Paco, Juan, Emilia, Maribel, Paco, entre otros. Porque con vuestro trabajo habéis facilitado el mío.*



*Al personal del CIC-UGR, gracias Nieves por tu buen trabajo con los cultivos celulares, por aportarnos tus conocimientos y tu simpatía, gracias al personal del animalario, Jesús Zúñiga y a M<sup>a</sup> José por el buen servicio que nos habéis proporcionado.*

*Gracias a Eduardo y Josefina (SICAL), por vuestra eficacia y honradez a la hora de traernos el material que os pedimos.*

*Quiero agradecer a las personas “apañadas” que conocí a mi paso por el Departamento por Bioquímica, donde empecé en el mundo de la investigación, sobre todo a M<sup>a</sup> Ángeles, Raúl, José María, Dámaso y, de forma especial, a M<sup>a</sup> José.*

*A Andrés, Laura y a vuestros hijos, gracias no sólo por ser unos buenos amigos, sino porque sois parte de mi familia.*

*Gracias a mis paisanos por los momentos de alegrías y penas que hemos compartido lejos de nuestras familias, y por “sufrir” juntos nuestras tesis.*

*Gracias a mis amigas desde hace tantos años, Inés y M<sup>a</sup> Dolores, por vuestra amistad incondicional y por los buenos y malos momentos compartidos. Gracias, M<sup>a</sup> Dolores, por convencerme para ir a conocer a unos profesores que tenías en Biología, que aunque muy exigentes, eran unos buenos profesores, ¡qué razón tenías!*

*A mis amigos de facultad, que siempre me habéis escuchado y animado, gracias por poder contar con vosotros siempre que os he necesitado, estéis cerca o lejos, gracias a Ía, Laura, Natalia, Pilar, Cristina, Teresa, Ana, Sonia y Luis, Fátima, M<sup>a</sup> José, Antonio, Sergio y Javi.*

*Gracias a Leticia por todo lo que hemos pasado juntas y por tu empatía.*

*Gracias a mis primos Ali y Ahmed, por todo lo que hemos compartido, ya mismo estáis vosotros terminando también.*

*Un agradecimiento muy especial a mis padres y hermanos, todo lo que pueda decir se queda corto. A mis padres, porque sois un ejemplo a seguir, por todo lo que me habéis enseñado, por educarme, y por enseñarme a seguir siempre hacia delante, pase lo que pase. A mi hermana Wafá´a, por dónde empezar...simplemente, por ser “mi otra mitad”. A mi hermano Ala´a, porque sé que al final siempre puedo contar contigo, sobre todo con mis problemas con la alta tecnología. Miles de gracias a los cuatro.*

*Finalmente, quiero disculparme ante aquellas personas que habéis aguantado de forma ejemplar mi hipersensibilidad de los últimos meses debida al agobio de la tesis, gracias por vuestras paciencia y comprensión, y por demostrarme de esta manera vuestro cariño.*

*En último lugar, gracias al más grande, al que me da todo lo que tengo, al que me cuida y me protege y mantiene en mí la esperanza, gracias a DIOS por todo.*

## **Acknowledgment**

*Thanks to my supervisor at the Institute of Molecular Biology and Physiology (University of Copenhagen), Dr. Ivana Novak, for give me the opportunity of be a member of your group during my stay in your lab. Actually, it was a very enriching experience concerning personal and professional aspects. Thanks also for inviting me to the Sandbjerg Meeting on Membrane Transport.*

*I would like thank all the personnel at the Zoophysiology department of the University of Copenhagen, specially I appreciate Susanne, Ida, Simon, Sofie, Anni and Mette for your kind, patient and friendly treatment.*

*Thanks to my uncle Taher, Genalyn, Sarah and Jasmin for share your lives with me during my visit to Copenhagen, I enjoyed very much with you.*

**شكر**

*اشكر عائلتي في العراق على تشجيعهم المستمر لي رغم بعد المسافه والظروف التي يمرون بها.*



***A mis padres***  
***A mis hermanos***



«Alá es la luz de los cielos y de la tierra. Su luz es comparable a una hornacina en la que hay un pabilo encendido. El pabilo está en un recipiente de vidrio, que es como si fuera una estrella fulgurante. Se enciende de un árbol bendito, un olivo, que no es del Oriente ni del Occidente, y cuyo aceite casi alumbra aun sin haber sido tocado por el fuego. ¡Luz sobre luz! Alá dirige su luz a quien quiere. Alá propone parábolas a los hombres. Alá es omnisciente» (Corán: Sura 24 "La luz", aleya 35)



## ABREVIATURAS

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> :	Concentración citosólica de Ca <sup>2+</sup>
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>o</sub> :	Concentración extracelular de Ca <sup>2+</sup>
AA:	Ácido araquidónico ( <i>arachidonic acid</i> )
AB:	Ácidos biliares
ACh:	Acetilcolina ( <i>acetylcholine</i> )
AG:	Ácidos grasos
AIN93G:	Dieta semisintética para ratas en crecimiento del <i>American Institute of Nutrition</i>
AM:	Acetoximetil éster
AR42J:	Línea celular de pancreatoma de rata ( <i>rat pancreatoma cell line</i> )
ATPasa:	Adenosina trifosfatasa
BSA:	Albúmina sérica bovina ( <i>bovine serum albumin</i> )
cAMP:	Adenosina monofosfato cíclica
CCE:	Entrada capacitativa de calcio
CCK:	Colecistoquinina ( <i>cholecystokinin</i> )
CCK-8:	Colecistoquinina-octapéptido ( <i>cholecystokinin-octapeptide</i> )
cDNA:	Ácido desoxiribonucleico complementario ( <i>complementary DNA</i> )
CIC-UGR:	Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada ( <i>Scientific Instrumentation Centre at the University of Granada</i> )
DHA:	Ácido docosahexaenoico
DMS:	Diferencia Menos Significativa (véase <i>LSD</i> )
DO:	Densidades ópticas
DX:	Dexametasona
ECACC:	Colección Europea de Cultivos Celulares ( <i>European Collection of Cell Cultures</i> )
EPA:	Ácido eicosapentaenoico
ER:	Retículo endoplasmático
ERO:	Especies reactivas de oxígeno (véase <i>ROS</i> )
FCS:	Suero fetal bovino ( <i>fetal calf serum</i> )
GLC:	Cromatografía gas-líquida ( <i>gas-liquid chromatography</i> )
HEPES:	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HNF4 $\alpha$ :	Factor hepático nuclear-4- $\alpha$ ( <i>hepatic nuclear factor-4-<math>\alpha</math></i> )



HSD:	Diferencia honestamente significativa ( <i>Honestly significant difference</i> )
IL-1:	Interleuquina-1( <i>interleukin-1</i> )
IL-6:	Interleuquina-6( <i>interleukin-6</i> )
IP <sub>3</sub> :	Inositol 1,4,5-trisfosfato
LDH:	Lactato deshidrogenasa ( <i>lactate dehydrogenase</i> )
LSD:	Diferencia Menos Significativa ( <i>Least Significant Difference</i> )
MODS:	Síndrome de disfunción multiorgánica ( <i>Multiple organ dysfunction syndrome</i> )
MUFA:	Ácidos grasos monoinsaturados ( <i>monounsaturated fatty acids</i> )
NAADP:	Ácido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato
NAD <sup>+</sup> :	Nicotín-adenín dinucleótido
NADH:	Forma reducida del NAD <sup>+</sup>
NADPH:	Nicotín-adenín dinucleótido fosfato ( <i>nicotin adenine dinucleotide phosphate</i> )
NFκB:	Factor nuclear kappa B ( <i>nuclear factor kappa B</i> )
NTCP:	Polipéptido de cotransporte taurocólico dependiente de Na <sup>+</sup> ( <i>Na<sup>+</sup>-dependent taurocholic cotransporting polypeptide</i> )
PBS:	Solución salina tamponada con fosfatos ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PI3K:	Fosfatidilinositol 3-kinasa
PIP <sub>2</sub> :	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PI-PLC:	Fosfatidilinositol-fosfolipasa C
PKC:	Proteína kinasa C ( <i>protein kinaseC</i> )
PLA <sub>2</sub> :	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC:	Fosfolipasa C
PP:	Polipéptido pancreático
PPAR:	Receptor activado por el proliferador de los peroxisomas ( <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i> )
PUFA:	Ácidos grasos poliinsaturados ( <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
PYY	Péptido tirosina-tirosina
ROS:	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive oxygen species</i> )
SERCA:	Ca <sup>2+</sup> -ATP-asa de retículo sarco/endoplásmico
SFA:	Ácidos grasos saturados ( <i>saturated fatty acids</i> )
SPSS:	Paquete estadístico para ciencias sociales ( <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> )
SREBP1c:	proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1c ( <i>sterol regulatory element binding protein-1c</i> )
TCDC:	Tauroquenodeoxicolato

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (*tumor necrosis factor-alpha*)  
TRP: Receptor de potencial transiente (*transient receptor potencial*)  
UFA: Ácidos grasos insaturados (*unsaturated fatty acids*)  
UI: Índice de insaturación (*unsaturation index*)  
WHO/FAO: Organización Mundial de la Salud/Organización para la Agricultura y la Alimentación (*World Health Organization/Food and Agriculture Organization*)







## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>I. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
II.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
III.1 ANIMALES Y DIETAS.....	25
III.2 CULTIVO CELULAR .....	29
III.3 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE MEMBRANAS PANCREÁTICAS DE RATA Y DE CÉLULAS AR42J .....	29
III.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	31
III.5 SECRECIÓN DE AMILASA Y LIBERACIÓN DE LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) .....	32
a) Protocolo de incubación de las células AR42J .....	32
b) Análisis de la actividad amilásica.....	33
c) Análisis de la actividad de LDH.....	35
III.6 DETERMINACIÓN DE CALCIO CITOSÓLICO .....	36
III.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	39
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
IV.1 Membrane lipid composition of pancreatic AR42J cells. Modification by exposure to different fatty acids. Exp Biol Med 232: 532-541, 2007 .....	43
1. Introduction.....	45
2. Materials and Methods.....	47

---

3. Results.....	51
4. Discussion.....	61
5. References.....	67
IV.2 Effects of dexamethasone and exposure period to different fatty acids in the culture medium on adaptation of membrane lipid profile and amylase secretion (En preparación) .....	71
1. Introduction.....	72
2. Materiales y Métodos.....	78
3. Resultados .....	82
4. Discusión.....	96
5. Bibliografía .....	110
IV.3 Interleukin-6 effects on amylase secretion and calcium signaling in pancreatic AR42J cells: modulation by membrane fatty acid composition (En preparación) .....	119
1. Introduction.....	120
2. Materiales y Métodos.....	124
3. Resultados .....	128
4. Discusión.....	134
5. Bibliografía .....	141
IV.4 Mechanisms involved with the early stages of acinar cell injury induced by bile acids in AR42J pancreatic acinar cells. Modulation by changes in membrane fatty acids (En preparación).....	147
1. Introduction.....	148
2. Materiales y Métodos.....	150
3. Resultados .....	154

4. Discusión.....	158
5. Bibliografía .....	162
<b>V. SUMMARY .....</b>	<b>169</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>175</b>
<b>VII. ANEXO DE PUBLICACIONES.....</b>	<b>179</b>







# Introducción



## **I. INTRODUCCIÓN**

Cada vez existe mayor preocupación por cómo la dieta influye en la salud y modifica el riesgo y/o severidad de distintas alteraciones patológicas crónicas. Durante el siglo pasado, se han acumulado gran cantidad de pruebas que muestran a los hábitos dietéticos como determinantes de la muerte prematura, incluyendo la asociada a infarto de miocardio, diabetes, enfermedades hepáticas, aterosclerosis y cáncer, aunque existe una heterogeneidad en la respuesta individual. Esta variabilidad puede explicarse en base a factores genéticos (polimorfismos) y epigenéticos (factores asociados a histonas y otros componentes asociados al genoma) (Milner, 2007).

En los últimos años la ciencia de la nutrición ha evolucionado a partir del concepto clásico de “suficiencia nutricional básica” al concepto de nutrición “óptima”. Las investigaciones se centran más en la identificación de aquellos componentes biológicamente activos de los alimentos que ofrezcan la posibilidad de mejorar las condiciones físicas y mentales, así como de reducir el riesgo a contraer enfermedades. La Nutrición del siglo XXI ha de seguir insistiendo en conseguir una dieta balanceada, pero además ha de tener el objetivo de maximizar las funciones fisiológicas para conseguir el máximo nivel de bienestar y salud, y simultáneamente minimizar el riesgo de enfermedades a lo largo de la vida (Roberfroid, 2002).

La finalidad de nuestro trabajo se basa en las recomendaciones dadas por la WHO/FAO, que en su informe acerca de la dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas (WHO, 2003) identifica la “nutrición como el principal determinante de enfermedad crónica susceptible de ser modificado” y afirma que “se necesita más investigación básica sobre algunos aspectos de los mecanismos que relacionan dieta y salud”.

En la reunión de expertos organizada por la WHO/ FAO (Roma, 1993) en la que se trató el papel de las grasas y aceites en la nutrición humana, se hizo hincapié en el hecho de que los descubrimientos en este campo tienen una importante implicación para los consumidores, los responsables de salud pública y la industria de la alimentación. Asimismo, se mencionó que están apareciendo constantemente en la literatura científica nuevas pruebas sobre los posibles beneficios o riesgos asociados a aspectos particulares

de la grasa dietética, pero que al mismo tiempo surgen controversias sobre esos descubrimientos, y teniendo en cuenta la magnitud de los intereses económicos implicados, el realizar una investigación seria, prudente e imparcial constituye un reto para la comunidad científica.

Esto es esencial, ya que cambiar los puntos de vista sobre los efectos beneficiosos o no de la grasa dietética puede afectar profundamente al consumo de determinados alimentos, la producción agrícola, las tecnologías de producción de alimentos, las técnicas de “marketing” para la venta y la educación nutricional impulsada por las autoridades en materia de salud pública.

El Departamento de Fisiología y el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Granada, conscientes de la importancia y de la trascendencia social de este campo de investigación, viene dedicando desde hace bastantes años gran parte de su esfuerzo al estudio de la influencia de la ingesta de aceite de oliva, componente principal de la Dieta Mediterránea, sobre distintos sistemas corporales y procesos (cardiovascular, envejecimiento, obesidad, etc.). La línea Fisiología Digestiva y Nutrición, que desarrolla nuestro grupo, trata de estudiar las repercusiones de la adaptación al tipo de grasa dietética sobre la función digestiva y, especialmente, sobre las secreciones pancreática, biliar y gástrica.

En el caso de la secreción pancreática, está demostrado que la proporción de las diferentes especies enzimáticas en el jugo pancreático no está programada constitutivamente. El tratamiento hormonal y la manipulación dietética inducen cambios notables en las actividades específicas de la mayoría de las proteínas enzimáticas importantes (Wormsley & Goldberg, 1972). Uno de estos mecanismos reguladores, habitualmente conocido como “adaptación pancreática a la dieta” ya fue descrito tiempo atrás por Pavlov (1898), y se ha estudiado desde entonces en varias especies (Lee *et al.*, 2006; Saravanan *et al.*, 2005; Birk *et al.*, 2004; Marion *et al.*, 2003; Hara *et al.*, 2001; Yago *et al.*, 2000; Graf *et al.*, 2000). La regulación de las enzimas digestivas por sus sustratos supuestamente pretende la optimización de la digestión y la consiguiente utilización de dichos sustratos. Existe consenso en que un aumento en la cantidad de un nutriente aumenta la actividad de la enzima que lo hidroliza; sin embargo, existe cierta controversia sobre la magnitud del cambio en la actividad de una

enzima tras la modificación de la cantidad del sustrato correspondiente, así como en lo concerniente al comportamiento de otras enzimas no implicadas en la digestión de este sustrato, aunque las diferencias son debidas probablemente al uso de distintos procedimientos experimentales, distinta composición de la dieta y duración de los periodos de adaptación (Yago *et al.*, 2000).

En lo que respecta a la influencia de la cantidad de grasa dietética existe acuerdo en los estudios, pero hay controversia sobre los efectos del tipo de este nutriente (grado de saturación o longitud de la cadena de ácidos grasos) en la adaptación de las enzimas pancreáticas.

Con el fin de conocer los mecanismos implicados en la secreción pancreática, nuestro grupo ha empleado modelos experimentales que van desde el sujeto entero, consciente o anestesiado, hasta suspensión de acinos pancreáticos frescos. Normalmente, en estos trabajos se han empleado dos aceites de consumo habitual en nuestro entorno geográfico: aceite de oliva y aceite de girasol, que difieren principalmente en su perfil de ácidos grasos. El aceite de oliva es rico en ácido oleico (18:1 n-9), un ácido graso monoinsaturado (MUFA), mientras que el ácido graso mayoritario del aceite de girasol es el ácido linoleico (18:2 n-6), un poliinsaturado de la serie n-6 (n-6 PUFA).

Comenzando por los trabajos en perros, nuestro grupo ha realizado estudios a corto y largo plazo viendo la influencia tanto de la cantidad como del tipo de grasa. Los estudios a corto plazo, que se llevaron a cabo en 2 grupos de perros alimentados durante 8 días con una dieta rica en grasa o rica en hidratos de carbono, no mostraron una adaptación rápida de la secreción pancreática exocrina a la cantidad de grasa de la dieta (Mañas *et al.*, 1996). Sin embargo, sí se confirmó (Yago *et al.*, 1997a; Ballesta *et al.*, 1990) en perros una adaptación a largo plazo (6 u 8 meses, respectivamente) de la secreción pancreática exocrina a diferentes niveles (91 g/Kg o 159-174 g/Kg, respectivamente) de dos tipos de grasas que difieren en la saturación de los ácidos grasos: aceite de girasol y aceite de oliva virgen. En estos trabajos se analizaron los efectos de estas dietas en términos de secreción de enzimas y electrolitos en ayunas y en respuesta a la comida en los animales conscientes. Los resultados mostraron que los animales alimentados con dietas ricas (159-174 g/kg) en aceite de oliva o de girasol

respondían de forma bastante diferente a la presencia de alimento en el tracto digestivo, y así, la ingesta de alimento fue seguida, en el grupo girasol, por un incremento significativo en el flujo de jugo pancreático y en la producción de bicarbonato y enzimas, mientras que en el grupo oliva se apreció en los mismos parámetros una respuesta mucho más atenuada (Ballesta *et al.*, 1990). Es más, la respuesta postprandial en los perros alimentados con dietas ricas en aceite de oliva era tanto más atenuada cuanto mayor era la cantidad de este aceite en la dieta (Ballesta *et al.*, 1990, Yago *et al.*, 1997a).

Estos efectos se podrían justificar por una posible influencia de la grasa de la dieta sobre la existencia de diferentes perfiles de hormonas gastrointestinales que controlan la secreción pancreática, hipótesis que se confirmó posteriormente en perros sometidos a dietas y periodos de adaptación similares en los que se midieron los niveles sanguíneos de dos hormonas inhibidoras de la secreción pancreática exocrina, el péptido tirosina-tirosina (PYY) y el polipéptido pancreático (PP) (Yago *et al.*, 1997b). En los animales alimentados con la dieta rica en aceite de oliva los niveles de PYY, tanto antes como después de la ingestión de comida, fueron significativamente mayores que los de los perros que recibieron aceite de girasol. En el caso del PP, las mayores diferencias aparecieron en ayunas, con valores también superiores en el grupo oliva. Por tanto, posiblemente las mayores concentraciones de las hormonas inhibidoras PP y PYY con dietas ricas en aceite de oliva pueden explicar, al menos en parte, las diferencias observadas entre ambos grupos dietéticos en el patrón de secreción postprandial.

En humanos nuestro grupo también ha demostrado que el tipo de grasa dietética afecta a los niveles de hormonas circulantes implicadas en el control de la secreción pancreática (Yago *et al.*, 1997c). En este estudio los sujetos se alimentaron durante 30 días con dietas que contenían aceite de oliva o aceite de girasol, los dos aceites más consumidos en nuestra área geográfica, como fuente principal de grasa. Se observó que los niveles plasmáticos de la hormona estimuladora colecistoquinina (CCK) eran más altos en el grupo de aceite de oliva que en el grupo de aceite de girasol durante la mayor parte del periodo postprandial. Además, en los sujetos que recibieron dieta con aceite de oliva las concentraciones de PYY y de PP eran mayores. Los resultados obtenidos en ambos grupos no mostraron diferencias significativas en la actividad de amilasa, lipasa, colipasa, quimiotripsina o tripsina en muestras de contenido duodenal en condiciones de

reposo. Respecto a las actividades enzimáticas en situación postprandial, sólo se encontraron diferencias significativas en el caso de la actividad de lipasa, la cual fue mayor en el grupo de aceite de oliva, probablemente en relación a los mayores niveles plasmáticos de CCK observados en este grupo (Yago *et al.*, 1997d). En parte, los resultados sugieren que quizás en esta especie serían necesarios periodos de adaptación a la dieta más largos que en las ratas para poner de manifiesto las grandes diferencias que se han observado en esta última especie (Yago *et al.*, 2000). No obstante, la ausencia de datos de producción enzimática debido a las limitaciones inherentes a la investigación en humanos, junto con los claros efectos del tipo de grasa dietética sobre los niveles de varios péptidos gastrointestinales nos obligan a no descartar una influencia del perfil de ácidos grasos de la dieta habitual sobre la secreción pancreática exocrina en humanos, incluso a medio plazo.

Los trabajos de nuestro grupo en perros y humanos indican que los efectos del tipo de grasa sobre la secreción pancreática exocrina en el animal entero están asociados, al menos en parte, a cambios en los niveles de ciertas hormonas gastrointestinales.

Sin embargo, podría haber mecanismos adicionales implicados. Los resultados obtenidos por otros autores apoyan la idea de que junto con este mecanismo hormonal, la grasa dietética puede actuar sobre la glándula pancreática también a través de un mecanismo mucho más directo. Así, se ha visto en la rata (Begin *et al.*, 1990) que la composición lipídica de las membranas de la célula acinar se altera por la naturaleza de los lípidos dietéticos, afectando esto al patrón de enzimas digestivas almacenadas en los gránulos de zimógeno.

Parece lógico que una distinta composición en ácidos grasos de membranas dé lugar a respuestas diferentes, puesto que estas moléculas son potentes reguladores de la función celular, fundamentalmente a tres niveles:

- Modulación de la actividad de proteínas de membrana (receptores, enzimas,...) a través de cambios en la fluidez de membrana o bien mediante unión específica a proteínas o interacciones superficiales proteína-lípidos.



- Diversas señales intracelulares parten de los fosfolípidos de membrana (ej. inositol trifosfato,  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, productos de peroxidación lipídica altamente citotóxicos) y, por tanto, su composición en ácidos grasos afectará diferentes vías de transducción de señales.
- Influencias directas sobre la expresión génica. Existen factores de transcripción regulados específicamente por ácidos grasos. En mamíferos estos factores incluyen a PPAR $\alpha$ , - $\beta$  y - $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptors*), HNF4 $\alpha$  (*hepatic nuclear factor-4- $\alpha$* ), NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) y SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein-1c*).

Por todo ello, realizamos una serie de investigaciones encaminadas a confirmar si la ingesta de diferentes grasas modifica el perfil de ácidos grasos de las membranas pancreáticas, y si esto podía implicar una diferente respuesta funcional.

Con este fin empleamos suspensiones de células acinares pancreáticas viables de ratas alimentadas durante 8 semanas con dietas que diferían en su fuente grasa (Yago *et al.*, 2004, 2006; Martínez *et al.* 2004). En estos trabajos pudimos comprobar que la composición en ácidos grasos de las membranas pancreáticas de rata se afectó profundamente por el tipo de grasa ingerida: las membranas de ratas alimentadas con aceite de oliva presentaron niveles significativamente mayores de MUFAs, particularmente ácido oleico, y las de los animales que recibieron aceite de girasol se enriquecieron en n-6 PUFAs, especialmente ácido linoleico (Yago *et al.*, 2004).

Estas modificaciones en la composición en ácidos grasos de las membranas pancreáticas, las cuales reflejan la composición del aceite mayoritario presente en la dieta, se acompañaron de cambios en la funcionalidad celular estimada en base a la secreción de amilasa y la movilización de calcio intracelular [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> en una suspensión de acinos frescos de rata, de tal modo que en comparación con el grupo de oliva, las células de animales del grupo girasol secretaron más amilasa en reposo pero la respuesta neta al octapéptido de CCK (CCK-8), tanto en lo que respecta a secreción de amilasa como a concentración citosólica de calcio [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>c</sub>, estaba marcadamente atenuada (Yago *et al.*, 2004).

La relevancia del hecho de que el patrón de respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  se afecte por la composición en ácidos grasos de membrana radica en el papel de este ión como mensajero intracelular universal. El  $\text{Ca}^{2+}$  puede mediar muchas acciones distintas en una misma célula, incluyendo respuestas rápidas como la secreción y procesos más lentos como la expresión de genes, y la especificidad de la respuesta final parece depender no sólo de la magnitud de sus incrementos citosólicos sino también de cómo sean esos incrementos: picos transitorios, aumentos sostenidos, oscilaciones de variada amplitud o frecuencia, etc. (Petersen & Burdakova, 2002). Esto nos llevó a utilizar la microscopía de fluorescencia para estudiar la señal oscilatoria de  $\text{Ca}^{2+}$  en células acinares cuyo perfil de membrana había sido manipulado por medio de la dieta (dieta oliva, rica en MUFAs, o un pienso comercial rico en grasa saturada y PUFAs), observando que en el grupo oliva las espigas producidas por CCK-8 20 pM eran de mayor amplitud y menor frecuencia, lo que de nuevo se acompañó de una mayor secreción de amilasa en respuesta a este secretagogo (Martínez *et al.*, 2004).

En definitiva, la manipulación dietética de los lípidos de membrana de la célula acinar afecta a su actividad secretora y esto en parte se debe a cambios en los mecanismos de señalización celular (Yago *et al.*, 2004, 2006; Martínez *et al.* 2004), lo que indica que la adaptación del páncreas exocrino al tipo de grasa dietética descrita previamente por nuestro grupo en distintas especies (Ballesta *et al.*, 1990; Serrano *et al.*, 1997; Yago *et al.*, 1997a,b,c,d; Serrano *et al.*, 1998; Yago *et al.*, 1998; Yago *et al.*, 2000) se debe, en parte, a que la grasa modula la respuesta de la célula acinar a secretagogos clásicos como CCK-8 (Martínez *et al.* 2004; Yago *et al.*, 2004, 2006).

En cualquier caso, cabe destacar que las modificaciones en la funcionalidad celular parecen no sólo ser dependientes del perfil de membrana sino también del secretagogo empleado. De hecho, cuando estimulamos con acetilcolina (ACh) acinos de ratas alimentadas con grasas diferentes (Yago *et al.*, 2006; Audi *et al.*, 2005), se puso de manifiesto que la secreción de amilasa en acinos era de nuevo distinta entre los grupos, pero en este caso el tipo de grasa no afectó a la respuesta en calcio citosólico, lo que puede estar relacionado con el hecho de que CCK-8 y ACh movilizan calcio a través de diferentes combinaciones de mensajeros celulares (Yago *et al.*, 2006).

Aunque los estudios a nivel celular proporcionan gran información, no podemos perder la perspectiva de lo que sucede en el animal entero. Por ello, siguiendo el mismo protocolo dietético que en los trabajos con células, también examinamos en ratas anestesiadas si las diferencias encontradas en la actividad secretora en acinos aislados repercutían de alguna forma en los parámetros secretores *in vivo* (Díaz *et al.*, 2003). Igual que en nuestros estudios previos, el perfil de ácidos grasos se alteró profundamente por las dietas reflejando el tipo de grasa consumida, aunque esto no se acompañó de variaciones en el contenido de proteínas o amilasa en la glándula. Sin embargo, sí se encontraron diferentes actividades secretoras *in vivo*. El flujo pancreático y la secreción de amilasa en condiciones basales fueron mayores en el grupo que consumió aceite de girasol. Los cambios a lo largo del tiempo en respuesta a una infusión de CCK-8 también mostraron diferentes patrones en cada grupo, con una respuesta más prolongada en el grupo oliva (hasta 2 horas desde el inicio de la infusión) mientras que en girasol solo se mantuvo significativamente elevada hasta los 40 minutos. Estos resultados reflejan hasta cierto punto los encontrados en acinos aislados pero, por otra parte, también evidencian que la secreción en el animal entero depende de otros factores, lo que nos obliga a ser muy cuidadosos a la hora de extrapolar conclusiones globales si partimos únicamente de datos obtenidos en modelos celulares.

Volviendo al nivel celular y después de haber confirmado que las modificaciones de membrana inducidas por el tipo de grasa afectan a la respuesta de la célula acinar a estímulos fisiológicos, lo siguiente era investigar el comportamiento frente a algunos agentes dañinos, como factores inflamatorios o especies reactivas de oxígeno (ERO).

Un gran número de estudios epidemiológicos han mostrado que las poblaciones Mediterráneas tienen una baja incidencia de enfermedades crónicas con etiología oxidativo-inflamatoria como las cardiovasculares, artritis reumatoide, etc. (Keys, 1980; Trichopoulou *et al.* 1995a; Trichopoulou *et al.* 1995b) lo que en parte se debe al perfil de la grasa ingerida, abundante en ácido oleico y en n-3 PUFAs de cadena larga debido al alto consumo de aceite de oliva y pescado, respectivamente. La pancreatitis aguda también es una patología de carácter oxidativo-inflamatorio, de incidencia creciente y sin una terapia específica eficaz. Es curioso que mientras que el papel de los ácidos grasos de la dieta ha sido ampliamente estudiado en otras enfermedades de este tipo,

como la aterosclerosis (Haidar & Soeatmadji, 2007; Matsumoto *et al.*, 2008; Bell *et al.*, 2007) o la enfermedad inflamatoria intestinal (Wild *et al.*, 2007; Razack & Seidner, 2007; Roy *et al.*, 2007; Andoh *et al.*, 2003), apenas se ha investigado su efecto en la pancreatitis aguda.

Aunque los mecanismos implicados todavía no están definitivamente claros, actualmente se piensa que, sea cual sea la etiología de la pancreatitis aguda, el desencadenante del proceso inflamatorio es un daño en la propia célula acinar. Precisamente, en las etapas iniciales de la pancreatitis el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  ha ganado mucha atención. La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células acinares pancreáticas en respuesta a concentraciones fisiológicas de CCK consiste en oscilaciones repetitivas generadas por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplásmico, oscilaciones que apenas modifican el contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  de este orgánulo y que, generalmente, quedan confinadas en el polo apical gracias a una barrera de mitocondrias que captan  $\text{Ca}^{2+}$  a favor de gradiente electro-químico (Sutton *et al.* 2003; Petersen & Sutton, 2006). El retorno a los niveles de reposo de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza mediante su expulsión al exterior gracias a una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-asa localizada en la membrana plasmática, compensándose estas pequeñas pérdidas con una entrada a través de canales de membrana, en lo que se denomina entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por almacenes, seguida de recaptación al retículo mediante una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-asa de retículo sarco/endoplásmico (SERCA) (Sutton *et al.* 2003; Petersen & Sutton, 2006). Por el contrario, la estimulación supramáxima con CCK-8 (un conocido método de inducción de pancreatitis aguda) produce una gran liberación de calcio del retículo que agota este almacén lo que, para compensar, activa enormemente la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por almacenes (Parekh & Penner, 1997). Esta entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  causa elevaciones globales que además se mantienen un tiempo ya que la actuación de las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-asas es relativamente lenta.

Muchos procesos dañinos en la célula acinar son dependientes de elevaciones globales y sostenidas de la concentración citosólica del ion calcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ), entre ellos la activación intracelular de tripsina o la del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, como se ha confirmado en acinos pancreáticos mediante el modelo de hiperestimulación con CCK o ceruleína (Han & Logsdon, 2000). Es más, distintos factores implicados en la patogénesis de la pancreatitis aguda parecen ejercer sus acciones dañinas, al menos en parte, mediante la alteración de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, se ha sugerido que el daño

causado por algunas citoquinas pro-inflamatorias en el páncreas se debe a que aumentan la sensibilidad de la célula acinar frente a CCK (Viguerie *et al.*, 1994).

Otros mediadores clave en la patogénesis de la pancreatitis aguda son las ERO, especies para las que se ha descrito una generación intracelular excesiva en acinos tratados con concentraciones suprafisiológicas de CCK. Igualmente, en la pancreatitis experimental de etiología biliar se observa un importante grado de peroxidación lipídica y agotamiento de las defensas antioxidantes a nivel pancreático (Rau *et al.* 2000; Sevillano *et al.* 2003; Barlas *et al.* 2004; Yagci *et al.* 2004; Gulcubuk *et al.* 2006), ocurriendo inicialmente la generación de ERO en las células acinares (Uruñuela *et al.*, 2002), aunque más tarde este papel recae preferentemente en las células inflamatorias infiltradas (Rau *et al.* 2000; Uruñuela *et al.* 2002). De nuevo, uno de los mecanismos por los que las ERO producen daño y muerte celular es mediante la alteración de la señal de calcio, como nosotros mismos hemos observado en acinos de ratas alimentadas con un pienso estándar, en los que el oxidante tert butil hidroperóxido (Martínez-Burgos *et al.*, 2006) estimuló la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde almacenes mitocondriales y de retículo endoplásmico, produciendo aumentos sostenidos en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que además impidieron la aparición de las típicas respuestas al estimular posteriormente con CCK-8.

Por otro lado, al considerar el papel de las ERO en la pancreatitis aguda, tenemos que considerar el daño oxidativo asociado. Nuestras investigaciones han confirmado que las dietas con aceite de oliva dan lugar a membranas pancreáticas más monoinsaturadas, lo que en teoría las hace más resistentes, y las dietas con aceite de girasol a membranas más poliinsaturadas, lo que supuestamente las hace más susceptibles al daño oxidativo. Esto, que nosotros hemos comprobado indirectamente mediante la determinación de lactato deshidrogenasa (LDH) tras incubar acinos pancreáticos con menadiona y diferentes concentraciones de CCK-8 (Yago *et al.*, 2005), también lo han demostrado de manera más directa otros autores en distintos tejidos midiendo la producción de peróxidos lipídicos (Mataix *et al.*, 1998; Huertas *et al.*, 1999; Battino *et al.*, 2002).

Los resultados del trabajo desarrollado a lo largo de una serie de años y en particular, los efectos de la modificación del perfil de ácidos grasos de las membranas pancreáticas sobre la funcionalidad celular (actividad secretora, movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ ,

protección frente al daño oxidativo, etc) nos han conducido hacia un nuevo Proyecto financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia en el que estamos comenzando a trabajar ahora, con el objetivo de conocer los posibles cambios beneficiosos (preventivos o de atenuación de la gravedad de los daños) que se pueden producir en un modelo celular de pancreatitis como consecuencia de la modificación en el perfil lipídico de las membranas (enriquecidas en ácidos grasos monoinsaturados o en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3), o de la presencia del compuesto fenólico hidroxitirosol, así como de la existencia de posibles interacciones o potenciación entre ambos factores. En definitiva, queremos conocer si la modificación del perfil lipídico y/o la presencia de compuestos fenólicos afecta la funcionalidad celular y la susceptibilidad de la célula acinar frente a un estímulo nocivo clásico de pancreatitis aguda (ceruleína) que sabemos que desencadena en estas células un proceso oxidativo-inflamatorio muy definido. Tanto los ácidos grasos MUFA como los n-3 PUFA y el hidroxitirosol son componentes típicos de la Dieta Mediterránea, cuyos beneficios sobre la salud son indiscutibles.

Esta investigación requiere un modelo celular de pancreatitis. Sin embargo, el empleo de acinos pancreáticos viables requiere períodos de adaptación a la dieta relativamente largos, hay muchos parámetros que son difíciles de controlar, el proceso de preparación de la suspensión de acinos que hay que realizar previo a cada experimento puede ser en ocasiones traumático para las células y hace difícil la reproducibilidad de los datos. Por el contrario, en un cultivo celular el abanico de modificaciones que se pueden ensayar es más amplio y se obtiene mayor homogeneidad en los resultados que cuando se usan animales de experimentación. Por otro lado, existen motivaciones éticas que nos han hecho optar por un modelo de cultivo celular con el que evitaríamos el sacrificio de muchos animales de experimentación.

De acuerdo con nuestros propósitos, para poder estudiar a nivel celular los posibles efectos beneficiosos de algunos componentes de la Dieta Mediterránea en la pancreatitis aguda, es indispensable, como paso previo, el desarrollo y caracterización de un modelo celular basado en una línea de crecimiento continuo, la línea AR42J derivada de pancreatoma de rata. Precisamente, esto es lo que recoge esta Tesis Doctoral, cuyos objetivos describimos en el siguiente apartado.

**Bibliografía**

Andoh A, Tsujikawa T, Ishizuka I, Araki Y, Sasaki M, Koyama S, Fujiyama Y. N-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis. *Int J Mol Med* 12:721-725, 2003.

Audi N, Yago MD, Martínez MA, Singh J, Martínez-Victoria E, Mañas M. Effects of the type of dietary fat on acetylcholine-evoked amylase secretion and calcium mobilization in isolated rat pancreatic acinar cells. *J Physiol Biochem* 61: 207, 2005.

Ballesta MC, Mañas M, Mataix FJ, Martínez-Victoria E, Seiquer I. Long-term adaptation of pancreatic response to dietary fats of different degrees of saturation: Olive oil and sunflower oil. *Br J Nutr* 64:487-496, 1990.

Barlas A, Cevic H, Arbak S, Bangir D, Göksel S, Yegen C, Yegen BC. Melatonin protects against pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats: role of neutrófilos. *J Pineal Res.* 37: 267-275, 2004

Battino M, Quiles JL, Huertas JR, Ramirez-Tortosa MC, Cassinello M, Mañas M, Lopez-Frias M, Mataix FJ. Feeding fried oil changes antioxidant and fatty acid pattern of rat and affect rat liver mitochondrial respiratory chain components. *J Bioenerg Biomembr* 34:127-134, 2002.

Bégin ME, Ells G, St-Jean P, Vachereau A, Beaudoin AR. Fatty acid and enzymatic compositional changes in the pancreas of rats fed dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Int J Pancreatol* 6:151-160, 1990.

Bell TA 3rd, Kelley K, Wilson MD, Sawyer JK, Rudel LL. Dietary fat-induced alterations in atherosclerosis are abolished by ACAT2-deficiency in ApoB100 only, LDLr<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1228-1230, 2007.

Birk RZ, Regan KS, Boyle-Roden E, Brannon PM. Pancreatic lipase and its related protein 2 are regulated by dietary polyunsaturated fat during the postnatal development of rats. *Pediatr Res* 56:256-262, 2004.

Díaz RJ, Yago MD, Martínez-Victoria E, Naranjo JA, Martínez MA, Mañas M. Comparison of the effects of dietary sunflower oil and virgin olive oil on rat exocrine pancreatic secretion in vivo. *Lipids* 38:1119-1126, 2003.

Graf R, Valeri F, Gassmann R, Hailemariam S, Frick TW, Bimmler D. Adaptive response of the rat pancreas to dietary substrates: parallel regulation of trypsinogen and pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Pancreas* 21:181-190, 2000.

Gulcubuk A, Altunatmaz K, Sonmez K, Haktanir-Yatkin D, Uzun H, Gurel A, Aydin S. Effects of curcumin on tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in the late phase of experimental acute pancreatitis. *J Vet Med.* 53: 49-54, 2006.

Haidar, Soeatmadji DW. Effects of high-carbohydrate and high fat diet on formation of foam cells and expression of TNF-alpha in *Rattus norvegicus*. *Acta Med Indones* 39:119-123, 2007.

Han B, Logsdon CD. CCK stimulates mob-1 expression and NF- $\kappa$ B activation via protein kinase C and intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C344-C351, 2000.

Hara H, Akatsuka N, Aoyama Y. Non-essential amino acids play an important role in adaptation of the rat exocrine pancreas to high nitrogen feeding. *J Nutr Biochem* 12:450-457, 2001.

Huertas JR, Martinez-Velasco E, Ibáñez S, López-Frias M, Ochoa JJ, Quiles J, Parenti Castelli G, Mataix J, Lenaz G. Virgin olive oil and coenzyme Q10 protect heart mitochondria from peroxidative damage during aging. *Biofactors*. 9:337-43, 1999.

Keys A. *Seven Countries: A multivariate analysis of diet and coronary heart disease*. Boston: Harvard University Press, 1980.

Lee KY, Ahn HC, Kim C, Kim SH, Kim DK, Park HS. Pancreatic exocrine response to long-term high-fat diets in rats. *JOP* 7:397-404, 2006.

Mañas M, Yago MD, Quiles JL, Martínez de Victoria E. Absence of rapid adaptation of the exocrine pancreas of conscious dogs to diets enriched in fat or carbohydrates. *Arch Physiol Biochem*. 104:819-825, 1996.

Marion J, Romé V, Savary G, Thomas F, Le Dividich J, Le Huërou-Luron I. Weaning and feed intake alter pancreatic enzyme activities and corresponding mRNA levels in 7-d-old piglets. *J Nutr* 133:362-368, 2003.

Martínez MA, Lajas AI, Yago MD, Redondo PC, Granados MP, González A, Rosado JA, Martínez-Victoria E, Mañas M, Pariente JA. *Nutrition* 20:536-541, 2004.

Martínez MA, Yago MD, Lajas AI, Pariente JA, Martínez-Victoria E, Mañas M. *J Physiol* 548P:3P-4P, 2003.

Martínez-Burgos MA, Granados MP, González A, Rosado JA, Yago MD, Salido GM, Martínez-Victoria E, Mañas M, Pariente JA. Involvement of ryanodine-operated channels in tert-butylhydroperoxide-evoked Ca<sup>2+</sup> mobilisation in pancreatic acinar cells. *J Exp Biol* 209:2156-64, 2006.

Mataix FJ, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mañas M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*. 24:511-521, 1998.

Matsumoto M, Sata M, Fukuda D, Tanaka K, Soma M, Hirata Y, Nagai R. Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 197:524-533, 2008.

Milner JA. Nutrition in the 'omics' era. *Forum Nutr* 60:1-24, 2007.

Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*. 77: 901-930, 1997.



- Pavlov, JP. Die arbeit der verdanungsdrusen. Wiesbaden: Bergman, 1898.
- Petersen OH, Burdakova N. The specificity of Ca<sup>2+</sup> signalling. *Acta Physiol Hung.* 89: 439-450, 2002.
- Petersen OH, Sutton R. Ca<sup>2+</sup> signalling and pancreatitis: effects of alcohol, bile and coffee. *Trends in Pharmacological Sciences.* 27: 113-120, 2006.
- Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nüssler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis. Initiating event or mediator of tissue damage? *Ann Surg.* 231: 352-360, 2000.
- Razack R, Seidner DL. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 23:400-405, 2007.
- Roberfroid MB. Global view on functional foods: European perspectives. *Br J Nutr* 88:S133-S138, 2002.
- Roy N, Barnett M, Knoch B, Dommels Y, McNabb W. Nutrigenomics applied to an animal model of Inflammatory Bowel Diseases: transcriptomic analysis of the effects of eicosapentaenoic acid- and arachidonic acid-enriched diets. *Mutat Res* 622:103-116, 2007.
- Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham NZ, Ghafloorunissa. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *Eur J Endocrinol* 153:159-165, 2005.
- Serrano P, Yago M., Martínez de Victoria E, Medrano J, Mataix J, Mañas M. Influence of the type of dietary fat upon the plasma levels of secretin and pancreatic polypeptide in cholecystectomized humans. *Biogenic Amines* 14:313-330, 1998.
- Serrano P, Yago MD, Mañas M, Calpena R, Mataix J, Martinez-Victoria E. Influence of type of dietary fat (olive and sunflower oil) upon gastric acid secretion and release of gastrin, somatostatin and Peptide YY in man. *Dig Dis Sci.* 42:626-633, 1997.
- Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta.* 1639: 177-184, 2003
- Sutton R, Criddle D, Raraty MGT, Tepikin A, Neoptolemos JP, Petersen OH. Signal transduction, calcium and acute pancreatitis. *Pancreatology.* 3: 497-505, 2003
- Trichopoulou A, Katsouyanni K, Stuver S, Tzala L, Gnardellis C, Rimm E, Trichopoulos D. Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *J Natl Cancer Inst.* 87: 110-116, 1995b.
- Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Laggiou P, Polychronopoulos E, Vassilakou T, Lipworth L, Trichopoulos D. Diet an doverall survival in elderly people. *MBr Med J.* 311: 1457-1460, 1995a.

Uruñuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochim Biophys Acta.* 1588: 159-164, 2002.

Viguerie N, Bertrand V, Dufresne M, Davis E, Lefort S, Vita N, Vaysse N, Pradayrol L, Bastie MJ. Interleukin-6 regulation of CCK/gastrin receptors and amylase secretion in a rat pancreatic acinar cell line (AR4-2J). *Eur Cytokine Netw* 5:433-440, 1994.

WHO Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. WHO Technical Report Series 916, 2003.

Wild GE, Drozdowski L, Tartaglia C, Clandinin MT, Thomson AB. Nutritional modulation of the inflammatory response in inflammatory bowel disease--from the molecular to the integrative to the clinical. *World J Gastroenterol* 13:1-7, 2007.

Wormsley KG, Goldberg DM. The interrelationships of the pancreatic enzymes. *Gut* 13:398-413, 1972.

Yagci G, Gul H, Simsek A, Buyukdogan V, Onguru O, Zeybek N, Balkan M, Yildiz O, Sen D. Beneficial effects of N-acetylcysteine on sodium tarocholate-induced pancreatitis in rats. *J Gastroenterol.* 39: 268-276, 2004.

Yago MD, Díaz RJ, Martínez MA, Audi N, Naranjo JA, Martínez-Victoria E, Mañas M. Effects of the type of dietary fat on acetylcholine-evoked amylase secretion and calcium mobilization in isolated rat pancreatic acinar cells. *J Nutr Biochem* 17:242-249, 2006.

Yago MD, Diaz RJ, Ramirez R, Martinez MA, Mañas M, Martinez-Victoria E. Dietary-induced changes in the fatty acid profile of rat pancreatic membranes are associated with modifications in acinar cell function and signalling. *Br J Nutr* 91:227-234, 2004.

Yago MD, Gonzalez MV, Martinez-Victoria E, Mataix J, Medrano J, Calpena R, Perez MT, Mañas M. Pancreatic enzyme secretion in response to test meals differing in the quality of dietary fat (olive and sunflower oil) in human subjects. *Br J Nutr* 78:27-39, 1997d.

Yago MD, Mañas M, Gonzalez MV, Martinez-Victoria E, Perez MT, Mataix J. Plasma levels of cholecystokinin and peptide YY in human: response of dietary fats of different degrees of unsaturación (olive and sunflower oil). *Biogenic Amines* 13:319-331, 1997c.

Yago MD, Martinez de Victoria E, Huertas JR, Mañas M. Effects of the amount and type of dietary fat on exocrine pancreatic secretion in dogs after different periods of adaptation. *Arch Physiol Biochem.* 105:78-85, 1997a.

Yago MD, Martínez MA, Audi N, Singh J, Mañas M, Martinez-Victoria E. Menadione-induced cell injury in pancreatic acini from rats fed diets containing different types of dietary fat (virgin olive oil and sunflower oil). *J Physiol Biochem* 61:206-207, 2005.

Yago MD, Martínez-Victoria E, Díaz RJ, Martínez MA, Singh J, Mañas M. Adaptation of the exocrine pancreas to dietary fats. *J Physiol Biochem* 56:295-306, 2000.

Yago MD, Martínez-Victoria E, Mañas M, Martínez MA, Mataix J. Plasma peptide YY and pancreatic polypeptide in dogs after long-term adaptation to dietary fats of different degrees of saturation: olive and sunflower oil. *J Nutr Biochem.* 8: 502-507, 1997b.

Yago MD, Serrano P, Mañas M, Mataix J, Medrano J, Calpena R, Martinez-Victoria E. Release of secretin and somatostatin after test meals with different fatty-acid composition in cholecystectomized humans. *J Nutr Biochem.* 9:186-192, 1998.





## **II. OBJETIVOS**

### **II.1 OBJETIVO GENERAL**

Los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo han puesto de manifiesto que la grasa dietética influencia el perfil lipídico de las membranas de las células acinares de rata, y este hecho se asocia a una modulación de la actividad secretora y de las vías de señalización celular.

El objetivo general de esta memoria ha sido demostrar si la línea celular AR42J es un modelo *in vitro* válido para estudiar estas interacciones entre lípidos y funcionalidad celular, ya que los modelos *in vitro* parecen ser aconsejables para el estudio de los aspectos moleculares de este problema.

### **II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Este objetivo general lo hemos abordado a través de los siguientes objetivos específicos:

**1º.** Caracterizar las membranas celulares de este modelo *in vitro* y estudiar su capacidad de adaptación, para ello hemos seguido los siguientes pasos:

- conocer el perfil lipídico de membranas de las células de pancreatoma de rata AR42J diferenciadas hacia fenotipo exocrino
- investigar si las membranas de estas células se adaptan a un medio de cultivo enriquecido en determinados ácidos grasos (ácido oleico o ácido linoleico)
- comparar las variaciones del perfil lipídico de AR42J con las que ocurren en ratas alimentadas durante 8 semanas con dietas ricas en diferentes grasas
- evaluar si la diferenciación de las células AR42J con dexametasona afecta a la composición y adaptación de las membranas a diferentes ácidos grasos

- estudiar si el tiempo de adaptación a los ácidos grasos presentes en el medio de cultivo afecta al perfil lipídico de las membranas, tal como ocurre en especies animales

**2º.** Examinar la funcionalidad celular en respuesta a un secretagogo clásico, la colecistoquinina (CCK-8), para comprobar, si como en el caso de la rata, los cambios en la membrana modulan las vías de señalización y las respuestas biológicas. Para ello se determinaron cambios en:

- secreción de amilasa
- concentraciones y movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular

**3º.** Determinar si distintos estímulos implicados en los mecanismos fisiopatogénicos de distintas alteraciones de la glándula pancreática (inflamatorios, neoplásicos, etc.) tienen una repercusión diferente (mayor o menor) sobre las células AR42J en función del perfil lipídico de sus membranas, perfil que a su vez es consecuencia del proceso de adaptación a la adición de diferentes ácidos grasos en el medio. Con el fin de llevar a cabo este objetivo hemos ensayado dos sustancias:

- interleuquina-6 (IL-6) adicionada al medio de cultivo durante las 48 horas previas a las medidas de secreción de amilasa y de cambios en la concentración intracelular de calcio citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )
- ácidos biliares (AB), que son el agente etiológico mayoritario de la pancreatitis aguda, cuyo efecto se estudió en relación con la secreción de amilasa, y con el daño tisular que producen determinado por la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa al medio de incubación.







### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **III.1 ANIMALES Y DIETAS**

Hemos utilizado 27 ratas Wistar (figura 1) macho al destete, con pesos de 40-55g, procedentes del Servicio de Producción y Experimentación Animal del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC-UGR). Estas ratas se dividieron en tres grupos (9 animales en cada uno), como se muestra en la tabla 1, de tal manera que el peso medio de cada grupo era el mismo. Un primer grupo, que sirve como control (C), se alimentó durante 8 semanas con un pienso estándar para esta especie basado en cereal (Panlab A04, Laboratorios Panlab, Barcelona, España). Los otros dos grupos de ratas se alimentaron durante el mismo periodo con dos dietas semipurificadas basadas en una modificación de la dieta AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993); la diferencia entre ambas dietas la constituyó la fuente de grasa que fueron aceites comestibles comerciales: aceite de oliva virgen (ratas VOO, Fedeoliva, S.A., Jaén, España) o aceite de girasol (ratas SO, Koipe, S.A., Jaén, España). Las dietas VOO y SO se elaboraron en la Unidad de Producción de Dietas del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Granada. Se prepararon en polvo a partir de ingredientes químicamente definidos. Las dietas fueron empaquetadas en bolsas de plástico, selladas a vacío y enviadas a nuestro laboratorio, donde fueron conservadas a 4 °C y en oscuridad hasta su uso para evitar la oxidación de las grasas.



Figura 1: Rata Wistar

En la tabla 2 se muestra la composición del pienso estándar según el análisis realizado por el fabricante. La preparación de las dietas semipurificadas se realizó de acuerdo a los datos de la tabla 3, siendo las composiciones de los correctores mineral y vitamínico empleados las que detallamos en las tablas 4 y 5.

El perfil de ácidos grasos de las dietas (tabla página 48) se determinó por cromatografía gas-líquida (GLC) como se describe más adelante para la determinación de la composición de ácidos grasos en las membranas.

- **Grupo C (control):** Constituido por ratas alimentadas con un pienso comercial para esta especie, con bajo contenido en grasa, suministrada por el laboratorio Panlab.
- **Grupo VOO (oliva):** Constituido por ratas alimentadas con una dieta cuya fuente de grasa es aceite de oliva virgen, con alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados.
- **Grupo SO (girasol):** Constituido por ratas alimentadas con una dieta cuya fuente de grasa es aceite de girasol, con alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n-6*.

Tabla 1: Distribución de los grupos de ratas.

COMPONENTE	% (p/p)
Glúcidos	60.5
Proteína	15.4
Grasa	2.9
Fibra	3.9
Minerales	5.3
Agua	12

Tabla 2: Composición del pienso estándar

COMPONENTE	%(p/p)
Almidón de maíz	36.75
Caseína	20
Dextrosa	13.2
Aceite (*)	10
Sacarosa	10
Fibra (celulosa)	5
Mezcla mineral AIN93G	3.5
Mezcla vitamínica AIN93G	1
L-cistina	0.3
Bitartrato de colina	0.25

Tabla 3: Composición de la dieta experimental.

(\*) Aceite comercial de oliva virgen en la dieta del grupo VOO.  
 Aceite comercial de girasol en la dieta del grupo SO.



Componente	g/Kg	Componente	g/Kg
Carbonato cálcico	357.00	Cromo sulfato potásico 12H <sub>2</sub> O	0.27500
Fosfato potásico Monobásico	196.00	Acido bórico	0.08150
Cloruro sódico	74.00	Fluoruro sódico	0.06350
Citrato potásico H <sub>2</sub> O	70.78	Carbonato de níquel	0.03180
Sulfato potásico	46.60	Cloruro de litio	0.01740
Oxido de magnesio	24.00	Selenito sódico	0.01025
Citrato férrico	6.06	Iodato potásico	0.01000
Carbonato de zinc	1.65	Vanadato amónico	0.00660
Metasilicato sódico 9H <sub>2</sub> O	1.45	Paramolibdato amónico 4H <sub>2</sub> O	0.00795
Carbonato de manganeso	0.63		
Carbonato cúprico	0.30	Sacarosa en polvo	221.026

Tabla 4: Composición del corrector mineral empleado en la elaboración de las dietas (AIN93G).

Componente	g/Kg	Componente	g/Kg
Niacina	3.00	Pantotenato de calcio	1.60
Piridoxina clorhidrato	0.70	Tiamina clorhidrato	0.60
Riboflavina	0.60	Ácido fólico	0.20
Biotina	0.02	Vitamina K1	0.075
Vitamina B12 (0.1% en manitol)	2.50	Vitamina A palmitato (500 IU/g)	0.80
Vitamina D3 (400 IU/g)	0.25	Vitamina E acetato (500 IU/g)	15.00
Sacarosa en polvo	974.65		

Tabla 5: Composición del corrector vitamínico empleado en la elaboración de las dietas (AIN93G).

Durante el periodo de 8 semanas de adaptación a las dietas, los animales se alojaron en jaulas individuales situadas en habitaciones con temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C), y un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y con libre acceso a agua y comida. Todos los procedimientos fueron aprobados por los Comités Éticos de la Universidad de Granada del Ministerio de Ciencia y Tecnología. Los animales se manipularon de acuerdo con las directrices de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio y sacrificados por métodos humanitarios.

### **III.2 CULTIVO CELULAR**

Hemos utilizado la línea celular de pancreatoma de rata AR42J, procedente de la European Collection of Cell Cultures (ECACC N°: 93100618), proporcionada por el Banco Celular del CIC-UGR. Las células se cultivaron, de rutina, a 37 °C en una atmósfera con un 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire, en medio RPMI-1640 con 2 mM de glutamina y 10% de suero fetal bovino (FCS). La composición en ácidos grasos del FCS se muestra en la tabla de la página 48.

Los distintos tratamientos a los que se sometieron las células, previos a los ensayos, se especifican más adelante en cada uno de los trabajos correspondientes.

### **III.3 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE MEMBRANAS PANCREÁTICAS DE RATA Y DE CÉLULAS AR42J**

Al finalizar el periodo de adaptación a la dieta, las ratas en ayuno de 8 h se sacrificaron por golpe en la cabeza y dislocación cervical. Se extrajo el páncreas, separándolo de la curvatura mayor del estómago, del bazo, duodeno y del colon transversal. Una vez extraído el páncreas, se lavó en una solución salina fría (0.9% NaCl), se eliminó el tejido graso periférico y conectivo, así como los ganglios linfáticos y los vasos sanguíneos que aún permanecían unidos al tejido pancreático; a continuación se pesó.

Con respecto a las células AR42J, éstas se despegaron mecánicamente de los frascos de cultivo por simple pipeteado y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfatos (PBS).

El aislamiento de membranas crudas de los páncreas de ratas y de las células pancreáticas acinares AR42J se llevó a cabo por un método estándar descrito por Ferreira *et al.* (2002). Básicamente consiste en una lisis celular y homogeneización utilizando un homogeneizador tipo Potter con recipiente de vidrio y pistón de teflón, y dos centrifugaciones a 600xg durante 10 min, cuyos sobrenadantes se ultracentrifugaron finalmente a 100000xg durante 1 h (L8-70M Ultracentrifuge BECKMAN, rotor: 70000 r.p.m. máx. Type 70.1 TI AER. #5E 2145). La composición de la solución de trabajo y

en la que se resuspendió el *pellet* final de membranas es la siguiente: 50 mM Tris (Trizma base Reagent grade), 1 mM EDTA, 154 mM KCl, pH 7.4. Las membranas aisladas fueron congeladas y mantenidas a -80 °C hasta su análisis.

La extracción de lípidos y la metilación de los ácidos grasos se hicieron en un solo paso según la técnica descrita por Lepage & Roy (1986). Brevemente, a las fracciones de membranas distribuidas en tubos de vidrio con tapón de rosca se les adicionó metanol:benceno (4:1); tras una agitación se añadió cloruro de acetilo lentamente en agitación constante y posteriormente se incubaron en un baño termostático a 100 °C durante 1 h. Después de enfriar los tubos se adicionó carbonato potásico al 6%, a continuación se agitaron y se centrifugaron las muestras a 1700xg durante 10 min a 4 °C. Se recogió la fase orgánica con ayuda de pipetas Pasteur microcapilarizadas; esta fase, que contenía los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se evaporó en un sistema de vacío (figura 2: Savant Speed Vac Concentrator System, SC 110A) hasta eliminar completamente cualquier vestigio de humedad. El proceso de metilación hace incrementar la volatilidad de los ácidos grasos para facilitar el análisis cromatográfico.

Figura 2:  
Sistema de  
vacío Savant  
Speed Vac  
Concentrator  
System, SC  
110A.



Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se resuspendieron en hexano y se analizaron por GLC con un cromatógrafo modelo HP 5890 serie II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), equipado con un inyector automático, un detector de ionización de llama y una columna capilar de 60 m de longitud (32 mm de diámetro interno y 20 mm de grosor) impregnada con Sp 2330 FS (Supelco Sigma-Aldrich).

La identificación de los picos en los cromatogramas se realizó por comparación de los tiempos de retención obtenidos con una solución patrón de los ésteres metílicos de los ácidos grasos puros. Para su cuantificación se utilizó el método de normalización interna, es decir, se partió del principio de que todos los componentes de la muestra están representados en el cromatograma, de manera que el total de las áreas debajo de los picos representa el 100% de los constituyentes. Se calculó el porcentaje de un ácido graso dado mediante la determinación del porcentaje que representa el área de su pico en relación con la suma de las áreas de todos los picos.

### **III.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

Las células AR42J se procesaron en el Laboratorio de Preparación de Muestras Biológicas del CIC-UGR siguiendo un protocolo convencional para microscopía electrónica (Renau & Megías, 1998). Brevemente, esta preparación consistió en prefijar las células durante 2 h (0-4 °C) en tampón cacodilato 0.05 M, (pH 7.4) conteniendo glutaraldehído (1.5%) y formaldehído (1.0%). Se postfijaron en una solución acuosa de OsO<sub>4</sub> (1%) y ferricianuro potásico (1%) durante 1 h (0-4 °C) en oscuridad. Después se pasaron a través de ácido tánico 0.15%, en tampón cacodilato durante 1 min, a temperatura ambiente, y se trataron con acetato de uranilo 2.0%, en agua bidestilada, 2 h, en oscuridad. Se aplicaron (0-4 °C) concentraciones crecientes de etanol (50, 75, 90, 95 y 3x 100%) durante 5 min cada una para deshidratar. Las muestras se infiltraron en resina epoxi (Epon) empleando una serie de mezclas de etanol-resina y, finalmente, se cortaron secciones ultrafinas (500-700 µm), se montaron en rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, examinándose con un microscopio electrónico de transmisión, Zeiss EM 902 (Zeiss, Oberkochen, Germany) a 80 kV por el personal del Servicio de Microscopía Electrónica de Transmisión del CIC-UGR.



### **III.5 SECRECIÓN DE AMILASA Y LIBERACIÓN DE LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)**

#### **a) Protocolo de incubación de las células AR42J**

Las células AR42J se despegaron mecánicamente de los frascos de cultivo por pipeteo suave. Tras eliminar el medio de cultivo por centrifugación (100xg, 5 min, 4 °C) se realizó un lavado con solución de incubación (Tabla 6) y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. El sedimento celular se resuspendió en solución de incubación para lograr una densidad celular de, aproximadamente, 350,000 células/mL. Alícuotas (500 µL) de la suspensión celular se incubaron a 37 °C durante 50 min con agitación suave y oxigenación, en presencia de diferentes concentraciones de las sustancias a ensayar (colecistoquinina-octapéptido y/o sales biliares) seguido de una centrifugación de 2 min a 350xg y 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se congelaron para la posterior determinación de la actividad enzimática liberada por las células. Las células expuestas sólo al medio de incubación sirvieron como controles no estimulados (liberación basal de enzima). Al inicio del periodo de incubación, se centrifugó una alícuota de la suspensión celular durante 2 min a 350xg (4 °C), para analizar la actividad enzimática de fondo en el sobrenadante (tubos cero). Este valor se restó a todos los valores obtenidos tras la incubación. La actividad enzimática total fue determinada en alícuotas de la suspensión acinar (tubos totales) tras la lisis de las células con una solución de Tritón X-100 al 2% en tampón fosfatos (20 mM fosfato sódico, 6.7 mM NaCl, pH 6.9 a 37 °C) (Bernfeld, 1955).

Producto	Concentración
Glucosa	11.667 mM
NaCl	99.275 mM
KCl	5.967 mM
Piruvato	4.967 mM
Fumarato diNa	4.292 mM
Glutamato monohidr.	4.917 mM
Sol. Aminoácidos BME* (x50)	0.417 mL/L
HEPES	24.804 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.17 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.2 mM
Sol. Vitaminas (x100)	100 µL/L
Glutamina	0.307 g/L
Inhibidor de tripsina	0.097 g/L

Tabla 6: Solución de incubación.

El estímulo utilizado para conocer la capacidad secretora de enzima en células AR42J fue colecistoquinina-octapéptido (CCK-8 sulfatada) a distintas concentraciones (desde  $10^{-11}$  M hasta  $10^{-7}$  M). En algunos experimentos se examinó el efecto de la sal biliar tauroquenodeoxicolato sódico (TCDC-Na, 1mM), tanto sola como combinada con distintas concentraciones de CCK-8 ( $10^{-11}$  M -  $10^{-7}$  M) sobre la liberación enzimática.

#### b) Análisis de la actividad amilásica

En todos los casos, la amilasa liberada al medio se cuantificó por espectrofotometría mediante una modificación del método de Bernfeld (1955). Esta determinación está basada en la hidrólisis de un sustrato de almidón soluble por parte del enzima cuando se incuba con la muestra problema, y la valoración posterior de la maltosa liberada tras la reacción. En resumen, 200 µL de una solución de almidón al 1% en tampón fosfato de Bernfeld se adicionaron a 200 µL de sobrenadantes

convenientemente diluídos, y tras 15 min exactos de incubación a 37 °C con agitación suave, se les adicionó a las muestras 400 µL de reactivo de maltosa (preparado según el siguiente cuadro) y se pusieron en hielo. Posteriormente se introdujeron en un baño a 100 °C durante 10 min. Tras enfriarlas se diluyeron, y la densidad óptica (DO) se leyó a 530 nm en un lector de placas de multidetección, modelo Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc.). Los datos se registraron usando el software Gen5™ de Bio Tek.

**Reactivo de maltosa**

- Pesar:            2 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (D-0550 de Sigma)  
                      60 g de tartrato sódico-potásico tetrahidrato (S-2377 de Sigma)
- Disolver el ac dinitrosalicílico y el tartrato en aprox. 250 ml de agua.
- Añadir a lo anterior 60 ml de NaOH.2N.
- Agitar hasta completa disolución.
- Completar finalmente hasta 500 ml con agua destilada.

Conservar bien tapado a Tª ambiente en recipiente topacio. El color de esta solución pasa de amarillo a rojo pardo cuando se calienta en presencia de un azúcar reductor.

La maltosa liberada en cada tubo por acción de la amilasa de la muestra se cuantificó por comparación con una curva patrón de maltosa. A todas las DO obtenidas se les resta el valor del tubo de blanco sustrato (SB), el cual contiene tampón fosfato, almidón y reactivo de maltosa, para obtener la DO real. La maltosa liberada en la reacción amilasa-sustrato (y, por tanto, la DO) no es función lineal de la actividad amilásica (excepto para actividades amilásicas muy bajas). Sin embargo, la constante de reacción para la hidrólisis del almidón (k) sí es función lineal de la actividad amilásica para todo el rango. Calculamos K en cada muestra aplicando la siguiente ecuación (Willstatter, *et al.*, 1923; Lagerlof, 1942):

$$K = 1/t * \log [ \alpha / \alpha - mi ]$$

t = tiempo de incubación (15 min)

α = máxima cantidad de maltosa que el sustrato puede originar en nuestro sistema, en nuestro caso α = 1.50 mg, basándonos en que por cada 1 mg de almidón la máxima cantidad de maltosa que se puede originar es de 0.75 mg (Willstatter *et al.*, 1923).

mi = mg maltosa que se han producido en la muestra problema. Esta cantidad la conocemos a partir de la curva patrón.

La amilasa liberada al medio extracelular (sobrenadantes) durante la incubación se expresó como porcentaje del contenido celular total de amilasa (tubos totales).

$$\% \text{ actividad amilásica} = [(K_i - K_{\text{cero}}) / (K_{\text{tot}} - K_{\text{cero}})] * 100$$

donde:

K<sub>i</sub>: K de los tubos problema.

K<sub>cero</sub>: k de los tubos cero.

K<sub>tot</sub>: K de los tubos totales.

Además, para la secreción de amilasa estimulada por las distintas concentraciones de CCK-8, también hemos calculado la amilasa secretada neta, es decir, la diferencia entre la amilasa liberada por la correspondiente dosis de CCK-8 y/o TCDC y la amilasa basal (no estimulada).

$$\text{amilasa secretada neta} = (\text{amilasa secretada tras CCK y/o TCDC}) - \text{amilasa basal}$$

### c) **Análisis de la actividad de LDH**

Se repartieron 50 µL de los sobrenadantes directamente en cada pocillo de una placa, y se añadieron 100 µL de la mezcla reactiva preparada de acuerdo con las instrucciones de un kit comercial de Sigma (Stock N°: TOX-7). Tras la agitación, la placa se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Para terminar la reacción, se añadió a cada pocillo 15 µL de HCl 1N, se agitó y se leyó la densidad óptica a 490 nm. La reacción consiste en la reducción de NAD<sup>+</sup> por acción de la LDH. El NADH formado se usa para la conversión estequiométrica de un compuesto tetrazólico en su correspondiente derivado coloreado.

$$\% \text{ enzima liberada} = [(DO - DO \text{ tubo cero}) / (DO \text{ tubo total} - DO \text{ tubo cero})] * 100$$

La actividad LDH liberada se expresa como porcentaje de la actividad LDH total, obteniéndose este valor a partir de alícuotas de la suspensión celular a las que se añadirá solución de lisis antes de la centrifugación y del ensayo enzimático.

### III.6 DETERMINACIÓN DE CALCIO CITOSÓLICO

Las células AR42J que se recogieron del CIC-UGR se despegaron mecánicamente de los frascos de cultivo por simple pipeteo y se lavaron con PBS. Se resuspendieron en solución de Na-HEPES (pH 7.4) que contiene (g/l) BSA, 2; inhibidor de tripsina de soja, 0.1, y (mM) CaCl<sub>2</sub>, 1; NaCl, 130; KCl, 5; HEPES, 20; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; MgSO<sub>4</sub>, 1; glucosa, 10.

Posteriormente se cargaron con el indicador de calcio fluorescente ratiométrico fura-2 acetoximetil éster (AM) (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) mediante incubación durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de una concentración del indicador de 4 μM. A lo largo de este periodo el tubo se agitaba manualmente por volteo suave cada 5 min, aproximadamente. Tras una centrifugación (5 min a 100xg) para retirar la sonda fluorescente extracelular, las células se resuspendieron en una solución de perfusión (es la misma de Na-HEPES pero que no contiene inhibidor de tripsina ni BSA) y se dejaron en reposo durante 30-40 min a temperatura ambiente, para favorecer el *cleaving*, antes de empezar las medidas en el microscopio. El *cleaving* consiste en la hidrólisis de las uniones éster de la sonda fluorescente por parte de las esterasas endógenas liberando así el indicador de Ca<sup>2+</sup> cargado negativamente, atrapándolo en el interior de las células.

Tras un ligero pipeteo para favorecer la separación de grandes agregados celulares en células individuales o pequeñas agrupaciones de células, alícuotas de la suspensión celular (185 μL) se colocaron sobre un cubreobjetos pegado a la parte inferior de una cámara de perfusión (RC-21BDW Open Diamond Bath, Warner Instruments). Estos cubreobjetos se habían bañado previamente con poli-D-lisina (P0899, Sigma; 100 μg/mL) que mejora la adhesión de las células.

Tras añadir la suspensión celular a la cámara y esperar unos 10-15 min para facilitar la adhesión de las células al cubreobjetos, comenzamos a perfundir a un flujo

de 1 mL/min, aproximadamente. El sistema de perfusión consiste en jeringas que por gravedad llevan las soluciones a perfundir hasta un regulador de flujo (figura 3), y de ahí hacia la cámara de perfusión (figura 4), de la cual se va retirando el líquido sobrante por una bomba de aspiración. La cámara de perfusión está colocada en la plataforma (figura 5) sobre un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Eclipse TE 2000-S). Las células se excitaron alternativamente a 350 y 385 nm con un monocromador (Polychrome IV, Hill Photonics) siendo las imágenes emitidas (510 nm) capturadas por una cámara digital CCD (C-4880-81, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu) y los datos registrados con un software especializado (Aquacosmos 2.5, Hamamatsu Photonics). Tras la obtención de la línea basal, las células se perfundieron con una solución 1nM de CCK-8.

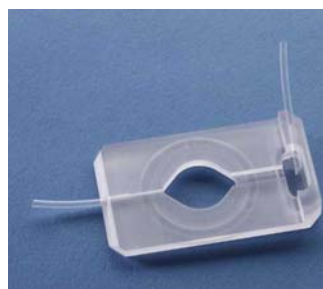
Figura 3: Reguladores de flujo:  
Vaccuum Solution  
Flow Control Valves  
Models FR-50 & FR-55S



Figura 5:  
Plataforma:  
P-2 Platform  
(Warner  
Instruments)



Figura 4:  
Cámara de perfusión:  
RC-21BDW  
Open  
Diamond Bath  
(Warner  
Instruments)



La excitación casi simultánea a dos longitudes de onda diferentes se debe a que el fura-2 presenta dos especies moleculares, una unida al ión  $\text{Ca}^{2+}$ , y la otra en forma libre, no unida a  $\text{Ca}^{2+}$ . El indicador unido a calcio presenta un máximo de excitación a 350 nm, mientras la otra forma no unida a  $\text{Ca}^{2+}$  presenta el máximo de excitación a 385 nm. En ambos casos, el máximo de emisión aparece a 510 nm. El ratio de fluorescencia (F350/F385) se calculó píxel a píxel y se usó para indicar los cambios en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .

Queremos señalar que nuestros estudios buscan un entendimiento general de los mecanismos implicados en la señalización de calcio, esto puede ser recabado de los ratios de fluorescencia (F350/F385) sin necesidad de ensayar una calibración precisa de la  $[Ca^{2+}]_c$ .



Figura 6: Sistema para la determinación de  $Ca^{2+}$

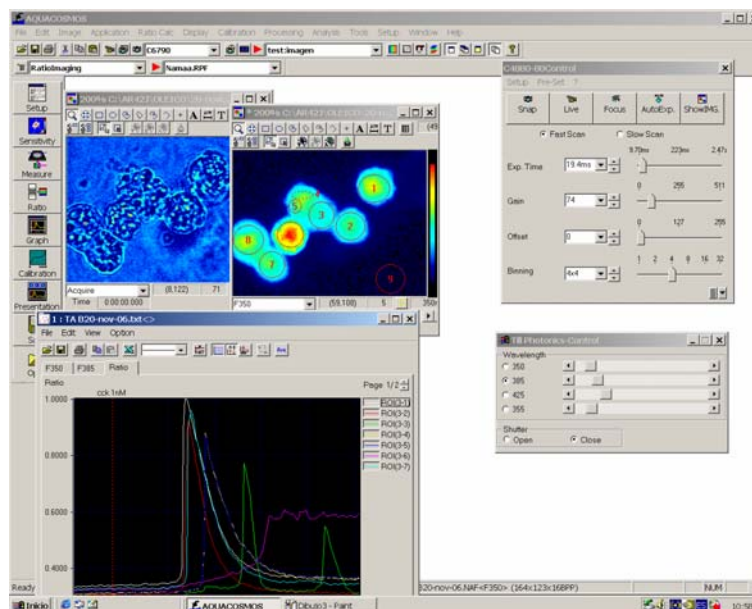


Figura 7: Software para la determinación de  $Ca^{2+}$  (Aquacosmos 2.5, Hamamatsu Photonics)

### III.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Salvo que se mencione de forma expresa lo contrario, los resultados presentados en el texto, tablas y figuras son valores medios y su error estándar ( $X \pm EEM$ ).

Se realizó en primer lugar una estadística descriptiva básica para cada uno de los grupos. La normalidad de la distribución de valores se examinó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. A las variables con distribución no normal se le aplicaron test no paramétricos de contraste de hipótesis.

Para las variables con una distribución normal, se aplicó el test de Levene de homogeneidad de varianzas, examinándose posteriormente las diferencias entre los diferentes grupos mediante un ANOVA de una vía (Procedimiento one-way de SPSS), utilizando como test a posteriori (*post-hoc*) el de la Diferencia Menos Significativa (Least Significant Difference, LSD), y el de Tukey's HSD (honestly significant difference) cuando la variable independiente tenía más de 2 categorías, o mediante el test de *t* de Student para variables independientes de dos categorías. También se realizó un análisis factorial (procedimiento modelo lineal general, univariante de SPSS).

Para estudiar la relación entre variables cuantitativas, se han realizado correlaciones (Procedimiento Correlaciones bivariadas de SPSS), calculando el coeficiente de correlación de Pearson

En todos los casos, sólo se consideraron significativas aquellas diferencias con valores de  $p < 0.05$ . Para el análisis estadístico se utilizó la aplicación informática SPSS para Windows (versiones 13.0.1, 14.0 y 15.0).



## **Bibliografía**

Bernfeld P. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ . *Meth Enzymol* 1:149-188, 1955.

Ferreira L, Perez-Gonzalez N, Llanillo M, Calvo JJ, Sanchez-Bernal C. Acute pancreatitis decreases pancreas phospholipid levels and increases susceptibility to lipid peroxidation in rat pancreas. *Lipids* 37:167-171, 2002.

Lagerlöf HO. Pancreatic function and pancreatic disease studied by means of secretin. *Acta med. scand* 128:S17-S33.

Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27:114-120, 1986.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123:1939-1951, 1993.

Renau J, Megías L. *Manual de técnicas de Microscopia Electrónica (M.E.T.). Aplicaciones Biológicas*. Granada, Spain: Editorial Universidad de Granada, 1998.

Willstatter R, Waldschmidt-Leitz E, Hesse ARF. Über Pankreas-Amylase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 126:143-168, 1923.





**Membrane Lipid Composition of Pancreatic AR42J  
Cells. Modification by Exposure to Different Fatty  
Acids**

**NAMA´A AUDI,\* MARÍA D. MESA,† MARÍA A. MARTÍNEZ,\* EMILIO**

**MARTÍNEZ-VICTORIA,\* MARIANO MAÑAS,\* AND MARÍA D. YAGO\*<sup>1</sup>**

*\*Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology, University of Granada, C/ Ramón y Cajal 4, 18071 Granada, Spain*

*†Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Nutrition and Food Technology, University of Granada, C/ Ramón y Cajal 4, 18071 Granada, Spain*

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed at Institute of Nutrition and Food Technology C/ Ramón y Cajal, 4 18071 Granada, Spain Telephone: -34-958-248321 Fax: -34-958-248326 E-mail: [mdyago@ugr.es](mailto:mdyago@ugr.es)

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (BFI2002-02772) and from Junta de Andalucía (Ayuda Retorno M.D.Y.).

**Dietary fat type influences fatty acids in rat pancreatic membranes, in association with modulation of secretory activity and cell signalling in viable acini. We aimed to confirm whether AR42J cells are a valid model to study the interactions between lipids and pancreatic acinar cell function. For this purpose we have i) compared the baseline fatty acid composition of AR42J cells with that of pancreatic membranes from rats fed a standard chow; ii) investigated if fatty acids in AR42J membranes can be modified in culture; and iii) studied if similar compositional variations that can be evoked in rats when dietary fat type is altered occur in AR42J cells. Weaning Wistar rats were fed for 8 weeks either a commercial chow (C) or semi-purified diets containing virgin olive oil (VOO) or sunflower oil (SO) as fat source. AR42J cells were incubated for 72 hs in medium containing unmodified fetal calf serum (FCS, AR42J-C cells), FCS enriched with 18:1 n-9 (AR42J-O cells) or FCS enriched with 18:2 n-6 (AR42J-L cells). Fatty acids in crude membranes from rat pancreas and AR42J cells were determined by gas-liquid chromatography. Differences in membrane fatty acids between C rats and AR42J-C cells can be explained in part by variations in the amount of fatty acids in the extracellular environment. Supplementation of FCS with 18:1 n-9 or 18:2 n-6 changed the fatty acid spectrum of AR42J cells in a manner that resembles the pattern found, respectively, in VOO and SO rats, although AR42J-L cells were unable to accumulate 20:4 n-6. The AR42J cell line can be a useful tool to assess the effect of membrane compositional changes on acinar cell function. However, differences in baseline characteristics, and perhaps fatty acid metabolism, indicate that results obtained in AR42J cells should be confirmed with experiments in the whole animal.**

**Key words:** dietary fat; virgin olive oil; sunflower oil; AR42J; rat pancreas; cell model; membrane fatty acid; oleic acid; linoleic acid

**Short title:** Membrane fatty acid profile of AR42J cells

## **1. Introduction**

Recent research in nutritional science is trying to elucidate the effect of dietary lipids on membrane composition and function. Membrane fatty acid composition can be modified in many different types of mammalian cells. The changes can be of sufficient magnitude to affect a number of cellular functions, including carrier-mediated transport, transduction pathways, activity of membrane-bound enzymes, receptor binding and exocytosis processes (Clandinin *et al.*, 1991; Vajreswari & Narayanareddy, 1992; Quiles *et al.*, 2001; Chapkin *et al.*, 2002). Many of the functional responses are probably caused directly by the membrane lipid structural changes, which affect either bulk lipid fluidity or specific lipid domains. The conformation of some transporters, receptors, and enzymes may be sensitive to changes in lipid microenvironment, this leading to changes in activity.

Studies in animal models have provided evidence about the effects of dietary fats on physiologic and pathologic processes. Work in our laboratory confirmed that the type of dietary fat strongly influences the fatty acid composition of rat (Yago *et al.*, 2004) and rabbit (Martínez *et al.*, 2003) pancreatic membranes. In the rat study, this was accompanied by a change in the secretory activity and mobilisation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stimulated by cholecystokinin-octapeptide (CCK-8) in viable pancreatic acini (Yago *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2004). Interestingly, by using the method of direct cannulation of the pancreatic duct in anaesthetized rats, we have been able to find a modification of CCK-induced secretory output as a function of the type of fat previously fed (Díaz *et al.*, 2003), which indicates that the modulating effect of this nutrient on exocrine pancreatic function is not limited to the cellular level. In a more recent study (Yago *et al.*, 2006) we have observed that chronic intake of diets differing in the fat type can also influence the responsiveness of acinar cells to acetylcholine, likely in relation to dietary-induced changes in cell membrane composition.

The effects of lipid modification on cell function are complex. Not only can they vary from one tissue to another, but also they are not exerted uniformly on all processes in a single cell line. For this reason it is not possible to make generalizations or to predict how a given system will respond to a particular lipid alteration. Within this context, cell culture appears to be a good approach for investigating the molecular

aspects of this problem. A much wider array of modifications is possible in cultured cells than in intact animals, and the environmental conditions can be controlled better. Because of homogeneity in morphology and composition, cell culture systems provide us with an elevated number of identical replicas, thus avoiding the serious problem of samples heterogeneity inherent to animal experimentation. Another valuable advantage, in terms of budget and time economy, is that animals require long periods of adaptation to dietary fats, whereas adaptation of cultured cells is achieved in a few days. In addition, ethical issues raised by animal experimentation support the use of cell culture. While cultured cells and tissues cannot replace the *in vivo* systems, they are valid alternative models in many situations.

The AR42J cell line is the only currently available cell line that maintains many characteristics of normal pancreatic acinar cells, such as the synthesis and secretion of digestive enzymes (Dietrich, 1996). AR42J cells show receptor expression and signal transduction mechanisms parallel to those of normal pancreatic acinar cells (Simeone *et al.*, 1995), and have been widely used to study secretion, signal transduction, cytoskeleton function, apoptosis and pancreatitis responses of the exocrine pancreas (Feick *et al.*, 1999; Bozem *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2003; Ikeda & Fukuoka, 2003; Song *et al.*, 2003; Satoh *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005). Thus, we thought that this cell line could be a suitable *in vitro* model for our purpose of examining the molecular mechanisms of the effect of dietary lipids on membrane composition and cell function. Surprisingly, we found that in spite of the wide usage in recent years, no information is available on the baseline lipid composition of AR42J cell membranes, and there are no attempts made in recorded scientific literature to modify the fatty acid composition of AR42J cells in culture. Then, our aim in the current study was to determine the membrane fatty acid composition of AR42J cells, to investigate whether these cells adapt their membranes after exposure to different fatty acids in the culture medium, and to confirm if this process is similar to the adaptation of the rat exocrine pancreas that occurs when dietary fat intake is modified (Yago *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2003; Yago *et al.*, 2006). To achieve our objectives, two separate groups of weaning rats were fed over 8 weeks on diets containing either virgin olive oil or sunflower oil as the fat source. In turn, culture medium for AR42J cells was supplemented with 18:1 n-9 or 18:2 n-6, the two major components of olive oil and sunflower oil, respectively.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Materials**

Unless otherwise stated, all chemicals and solvents of the highest grade available were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA) and Merck (Darmstadt, Germany).

### **2.2 Animals and Diets**

Twenty seven male weaning Wistar rats (weight 40–55 g; Animal Farm of the University of Granada, Granada, Spain) were divided into three groups (9 each) so that the average weight per group was the same. A first group, which served as control (control rats, C rats), was fed for 8 weeks with a standard cereal-based chow for this species (Panlab A04, Panlab Laboratories, Barcelona, Spain). The chow was composed of 15.4% protein, 2.9% fat, 60.5% carbohydrates, 3.9% fibre, 5.3% minerals and 12% water (data from the manufacturer's analyses). The other two groups of rats were fed over the same period with two semi-purified diets that were a modified version of the AIN-93G diet (Reeves *et al.*, 1993). These semi-purified diets were prepared in powdered form by mixing the fresh, chemically defined ingredients, according to (%): casein, 20; maize starch, 36.75; dextrose, 13.2; sucrose, 10; cellulose, 5; fat, 10; L-cystine, 0.3; choline bitartrate, 0.25; AIN-93G mineral mixture, 3.5; AIN-93G vitamin mixture, 1. The sources of fat were commercial edible oils obtained locally: olive oil (VOO rats, Fedeoliva, S.A., Jaen, Spain) or sunflower oil (SO rats, Koipe, S.A., Jaen, Spain). The VOO and SO diets were prepared at the Nutrition Unit of the Animal Farm (University of Granada, Granada, Spain), packed in plastic bags, sealed, and sent to our laboratory. Upon arrival, aliquots were taken for determination of water content by drying to constant weight in oven at 105°C. Average water content was 10% in both semi-purified diets. All diets were stored in darkness at 4 °C until used to avoid peroxidation. The fatty acid composition of the diets (Table 1) was determined by gas-liquid chromatography (GLC) as described later for the membrane fractions.



Table 1. Fatty acid composition of the experimental diets and fetal calf serum (FCS) used, respectively, in the rat and cell culture (AR42J) studies<sup>a</sup>

Fatty acid	Rat study			AR42J study
	VOO diet	SO diet	Commercial chow	FCS <sup>b</sup>
16:0	9.81	6.35	20.27	28.24
16:1 n-7	0.63	0.12	0.86	2.40
18:0	3.96	4.37	6.43	17.28
18:1 n-9	76.75	31.19	28.08	21.37
18:2 n-6	6.81	55.92	34.49	6.78
18:3 n-3	0.66	0.07	2.64	0.00
SFA	14.02	10.87	29.21	57.06
MUFA	77.67	31.48	31.21	25.68
PUFA	8.31	57.65	39.58	17.26
UFA	85.98	89.13	70.79	42.94
SFA/UFA	0.16	0.12	0.41	1.33

<sup>a</sup>Values are percentages of total fatty acid content (mean values of four replicates).

VOO, virgin olive oil; SO, sunflower oil; FCS, fetal calf serum; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids.

<sup>b</sup>Intact, unmodified FCS.

During the 8-week adaptation period to the diets, animals were housed individually in a temperature-controlled room ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), kept on a 12 h light-dark cycle and given free access to water and food. All procedures were approved by the Ethics Committees of the University of Granada and the Spanish Ministry of Science and Technology. Animals were handled according to the guidelines of the Spanish Society for Laboratory Animal Sciences and killed humanely.

### 2.3 Cell Culture

Rat pancreatoma AR42J cell line, proceeding from the European Collection of Cell Cultures (ECACC N<sup>o</sup>: 93100618), was supplied by the Cell Bank of the Scientific

Instrumentation Centre at the University of Granada (CIC-UGR, Granada, Spain). Cells were routinely cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum (FCS) and 2 mM glutamine. AR42J cells were used following treatment with 100 nM dexamethasone in culture medium for 72 h to induce differentiation (Bozem *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2003).

Maintenance, culture and chronic treatments (dexamethasone and fatty acids) of AR42J cells were carried out in the Tissue and Cell Culture Unit of the CIC-UGR (Granada, Spain) in order to optimize cell production while avoiding the risk of bacterial contamination. Cells were transferred to our laboratory for analyses.

Membrane fatty acid modifications in AR42J cells were evoked during the 72 h differentiation period according to a simple protocol based on a modification of the method of Chow *et al.* (1991). Briefly, fetal calf serum (FCS) was enriched in either 18:1 n-9 or 18:2 n-6 by addition of necessary volume of stock solutions (100 mM in absolute ethanol). This mixture was equilibrated for 1 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. During this time, 3 sonication pulses of 30 sec each were applied to facilitate binding of fatty acids to FCS proteins. FCS enriched with 18:1 n-9 or 18:2 n-6 was then added to the culture medium (AR42J-O and AR42J-L cells, respectively). Final concentration of added fatty acids in medium was 50 µM. Fatty acids were obtained from Sigma and were approx. 99% pure and cell culture tested. The pH of the medium did not differ with the addition of fatty-acid enriched serum. Control cells (AR42J-C cells) were fed the culture medium containing the intact, unmodified FCS. The viability of fatty acid-supplemented and not supplemented cells was found to be 95-98% by trypan blue exclusion method.

## **2.4 Collection of Crude Membranes**

At the end of the 8-week feeding period, overnight-fasted rats were killed by cervical dislocation. Each pancreas was quickly removed, trimmed free of fat, connective tissue and lymph nodes in cold saline solution (0.9% NaCl), blotted and weighed. AR42J cells were detached mechanically from culture flasks by gentle pipetting and washed twice in cold phosphate-buffered saline (PBS). Collection of crude membranes from rat pancreas and AR42J pancreatic acinar cells was accomplished by established methods (Ferreira *et al.*, 2002).

## **2.5 Analysis of Cell Membranes**

Lipid extraction and fatty acid methylation was done in a one-step reaction (Lepage & Roy, 1986). A GLC system, model HP 5890 series II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), equipped with an automatic injector and a flame ionization detector, was used to analyze fatty acids as methyl esters. GLC was performed using a 60-m-long capillary column (32 mm i.d. and 20 mm thickness) impregnated with Sp 2330 FS (Supelco, Bellefonte, CA, USA).

## **2.6 Electron Microscopy**

AR42J cells were processed by conventional procedures for electron microscopy (Renau & Megias, 1998) at the Biological Sample Preparation Laboratory of the CIC-UGR (Granada, Spain). In brief, cells were prefixed for 2 h at 0-4 °C in 1.5% glutaraldehyde and 1% formaldehyde in 50 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.4). The cultures were postfixed with 1% OsO<sub>4</sub> and 1% potassium ferricyanide for 1 h at 0-4 °C in the dark, and passed through 0.15% tannic acid in the above buffer, followed by treatment with 2% uranyl acetate for 2 h in darkness. Increasing concentrations of ethanol (50, 75, 90, 95, and 3x 100%) were used (5 min each, 0-4 °C) in the process of dehydration. The samples were then embedded in Epon<sup>TM</sup> epoxy resin through an ethanol:Epon series. Ultra-thin sections (500-700 µm) were cut, collected on copper grids, poststained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Zeiss EM 902 transmission electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) at 80 kV by personnel of the Microscopy Service of the CIC-UGR (Granada, Spain).

## **2.7 Statistical Analysis**

Unless otherwise expressly noted, results in the text, tables and graphs are reported as means ± SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare membrane fatty acid content between groups, and Tukey's HSD (honestly significant difference) was used for all *post hoc* comparisons (SPSS for Windows, version 13.0.1, 2005; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Values were considered to be significantly different when  $P < 0.05$ .

### **3. Results**

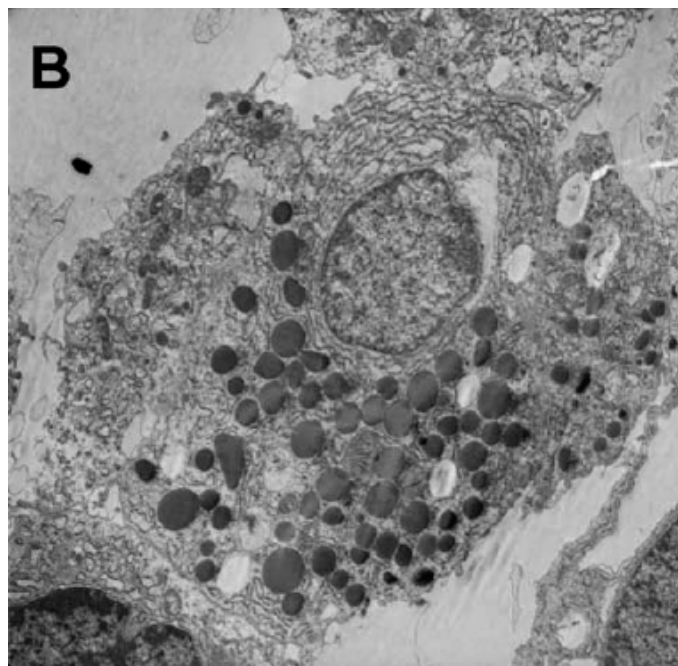
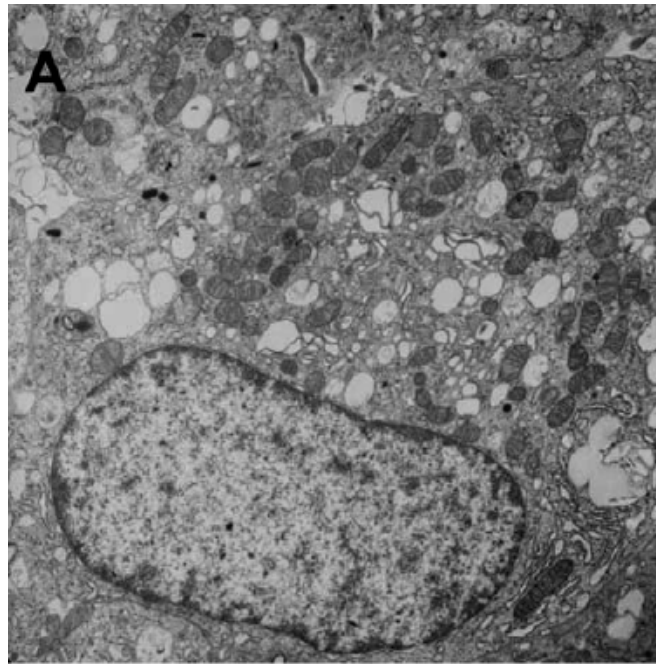
#### **3.1 Transmission Electron Microscopy (TEM)**

As a part of our objective of finding a cultured line of pancreatic acinar cells that could serve as an appropriate *in vitro* model to study the interaction between dietary lipids and membrane composition and function, it was pertinent to confirm dexamethasone-induced differentiation of AR42J cells. Fig. 1 shows a typical AR42J cell cultured with unmodified, intact, fetal calf serum in the absence (A) or presence (B) of 100 nM dexamethasone. At the ultrastructural level, the most striking effect of dexamethasone treatment for 72 h concerned the secretory granules. The results from our analysis showed that whereas in non-treated cells zymogen granules were rarely seen (Fig. 1A), in dexamethasone-treated cells the granules were very prominent, both in number and size (Fig. 1B). In addition, untreated cells looked relatively undifferentiated, with sparse rough endoplasmic reticulum consisting of vesicles and isolated small cisternae (Fig. 1A). Dexamethasone treatment, however, increased the amount of rough endoplasmic reticulum, which appeared as large stacked cisternae (Fig. 1B). So, the results from our analyses indicate that dexamethasone induced in this study the differentiation of AR42J cells towards an exocrine phenotype similar to that of a rat pancreatic acinar cell. There was no difference in the ability of dexamethasone to induce AR42J cell differentiation in the presence of fatty acid-supplemented serum compared with the unsupplemented one.

#### **3.2 Baseline Fatty Acid Profiles of Crude Membranes from Rat Pancreas and AR42J Cells**

Fatty acid profile of membranes from differentiated control AR42J cells (AR42J-C cells) and control rat (C rat) pancreas is detailed in Table 2. Major membrane fatty acids in AR42J-C cells, listed in decreasing order of abundance, were (mean values): 16:0 (28.05%), 18:1 n-9 (25.69%) and 18:0 (16.41%). Content of 18:3 n-3, 20:4 n-6, 16:1 n-7, 14:0, 18:2 n-6, and 20:0 was between 2-4 %. Among minor fatty acids (< 2%) in membranes from AR42J-C cells, those that should be noted include: 22:6 n-3 (mean value of 1.87%), 20:3 n-6 (1.44%), 22:0 (1.39%) and 24:0 (1.19%).

Figure 1. Electron micrograph of a typical AR42J cell cultured with unmodified fetal calf serum in the absence (A) or presence (B) of 100 nM dexamethasone for the 72 h prior to sample collection. Magnification: 4400x for both A and B.



Fatty acids in pancreatic membranes from C rats, listed in decreasing order of abundance, were (mean values): 16:0 (31.14%), 20:4 n-6 (18.10%), 18:2 n-6 (14.52%), 18:1 n-9 (13.84%), 18:0 (10.07%) and 16:1 n-7 (5.45%). For the rest of fatty acids detected, content was lower than 2% (see Table 2).

Comparison among C rats and AR42J-C cells showed that percent of most fatty

acid differed significantly ( $P < 0.05$ ), with only minor fatty acids such as 15:0, 17:0, 20:2 n-6 and 21:0 being similar. The most abundant fatty acid in both AR42J-C cells

Table 2. Fatty acid profile of pancreatic crude membranes from control rats (C rats) and control AR42J cells (AR42J-C cells)

Fatty acid	C rats <sup>b</sup>	AR42J-C cells <sup>c</sup>
6:0	0.00 ± 0.00 *	0.37 ± 0.04
10:0	0.00 ± 0.00 *	0.45 ± 0.06
12:0	0.08 ± 0.01 *	0.46 ± 0.03
14:0	1.36 ± 0.04 *	3.40 ± 0.20
14:1 n-5	0.09 ± 0.01 *	0.00 ± 0.00
15:0	0.21 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.34 ± 0.02
16:0	31.14 ± 0.32 *	28.05 ± 0.21
16:1 n-7	5.45 ± 0.12 *	3.47 ± 0.20
17:0	0.23 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.34 ± 0.02
18:0	10.07 ± 0.10 *	16.41 ± 0.26
18:1 n-9	13.84 ± 0.30 *	25.69 ± 0.41
18:2 n-6	14.52 ± 0.85 *	3.33 ± 0.12
18:3 n-6	0.39 ± 0.03 *	0.00 ± 0.00
18:3 n-3	0.13 ± 0.01 *	3.83 ± 0.20
20:0	0.22 ± 0.02 *	2.29 ± 0.17
20:1 n-9	0.35 ± 0.04 *	0.00 ± 0.00
20:2 n-6	0.19 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.19 ± 0.02
20:3 n-6	0.43 ± 0.02 *	1.44 ± 0.15
20:4 n-6	18.10 ± 0.23 *	3.80 ± 0.11
20:5 n-3	0.35 ± 0.01 *	0.58 ± 0.02
21:0	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.00 ± 0.00
22:0	0.24 ± 0.03 *	1.39 ± 0.10
22:1 n-9	0.00 ± 0.00 *	0.50 ± 0.03
22:6 n-3	1.04 ± 0.04 *	1.87 ± 0.10
23:0	0.05 ± 0.01 *	0.33 ± 0.02
24:0	0.48 ± 0.02 *	1.19 ± 0.06
24:1 n-9	1.06 ± 0.01 *	0.85 ± 0.03

<sup>a</sup>Values are percentages of total fatty acid content (means ± SEM)

C rats:  $n = 9$ ; AR42J-C cells:  $n = 18$  (from 6 batches of cells).

<sup>b</sup>C rats were fed a commercial chow for 8 weeks after weaning.

<sup>c</sup>AR42J-C cells were fed the culture medium containing unmodified fetal calf serum for the 72-h period (differentiation period) before the experiments.

<sup>d</sup> Not significant

\*  $P < 0.05$  compared with membranes from AR42J-C cells.

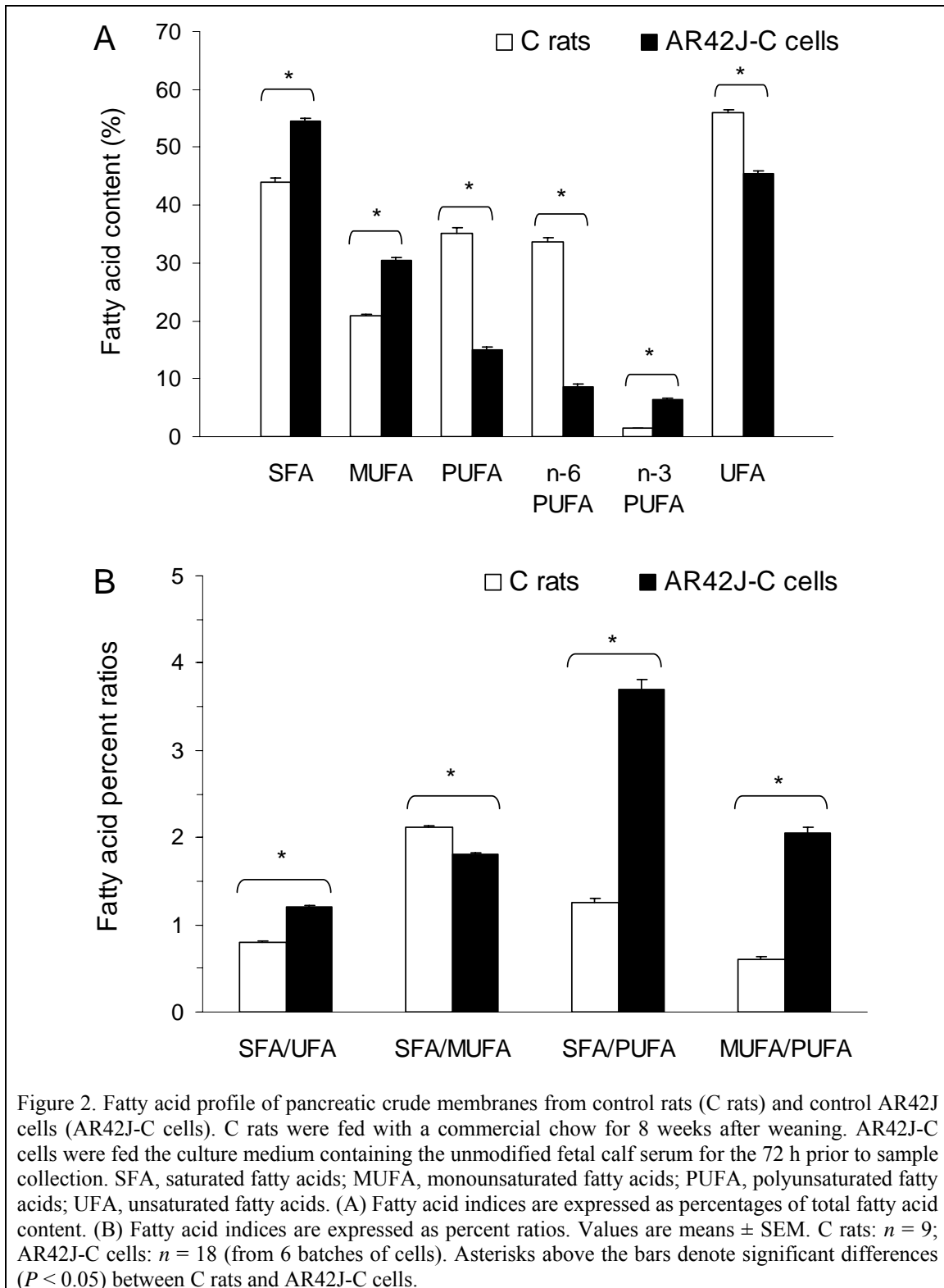
and pancreatic membranes from C rats was 16:0, although the content in rat ( $31.14 \pm 0.32\%$ ) was significantly ( $P < 0.05$ ) greater than that in cultured cells ( $28.05 \pm 0.21\%$ ). After 16:0, leading fatty acids in the rat were (mean values): 20:4 n-6 ( $18.10\%$  vs.  $3.80\%$  in AR42J-C cells,  $P < 0.05$ ) and 18:2 n-6 ( $14.52\%$  vs.  $3.33\%$  in AR42J-C cells,  $P < 0.05$ ). In turn, leading fatty acids (after 16:0) in cultured AR42J-C cells were: 18:1 n-9 ( $25.69\%$  vs.  $13.84\%$  in the rat,  $P < 0.05$ ) and 18:0 ( $16.41\%$  vs.  $10.07\%$  in the rat,  $P < 0.05$ ).

Percent values for fatty acids were also distributed differently in rat and AR42J membranes. In the rat, five fatty acids exhibited percent values higher than 10% (16:0, 20:4 n6, 18:2 n-6, 18:1 n-9 and 18:0), then there was 16:1 n-7 with approx. 5% and the remaining fatty acids showed percent values lower than 1.5%. In contrast, there are three major fatty acids in AR42J-C cells with values higher than 10% (16:0, 18:1 n-9 and 18:0), and six fatty acids in the range of 2-4%, the rest being minor fatty acids.

Differences in individual fatty acids between rat and cultured cells are reflected in indices, as summarized in Fig. 2. AR42J-C cells had a higher ( $P < 0.05$ ) proportion of saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA), whereas total PUFA and, particularly, n-6 PUFA percentages were higher ( $P < 0.05$ ) in rat pancreas (Fig. 2A). All percent ratios were also significantly ( $P < 0.05$ ) different (Fig. 2B).

### **3.3 Effect of feeding the experimental diets for 8 weeks on rat pancreatic crude membranes**

The fatty acid profile of pancreatic membranes (Table 3 and Fig. 3) was profoundly influenced by dietary treatments. Compared to control (C) rats, pancreatic membranes of rats fed the virgin olive oil (VOO) diet displayed higher ( $P < 0.05$ ) levels of 18:1 n-9 and 20:5 n-3, and lower ( $P < 0.05$ ) levels of 16:0, 16:1 n-7, 18:2 n-6 and 20:4 n-6 (Table 3). Content of 14:0, 18:0, 18:3 n-3 and 22:6 n-3 did not vary among C rats and VOO rats. As shown in Fig. 3A, the VOO diet caused a significant increase in MUFA (due to 18:1 n-9) compared to C rats, which was balanced by a decrease ( $P < 0.05$ ) in SFA (due to 16:0) and a decrease in n-6 PUFA (due to both 18:2 n-6 and 20:4 n-6).



When compared with rats fed the standard chow (C rats), pancreatic membranes of rats given the sunflower oil diet (SO) for 8 weeks showed (Table 3) a significant ( $P < 0.05$ ) increase in 18:0, 18:2 n-6 and 20:4 n-6, together with a significant decrease in 16:0, 16:1 n-7, 20:5 n-3 and 22:6 n-3. Values for 14:0, 18:1 n-9 and 18:3 n-3 were



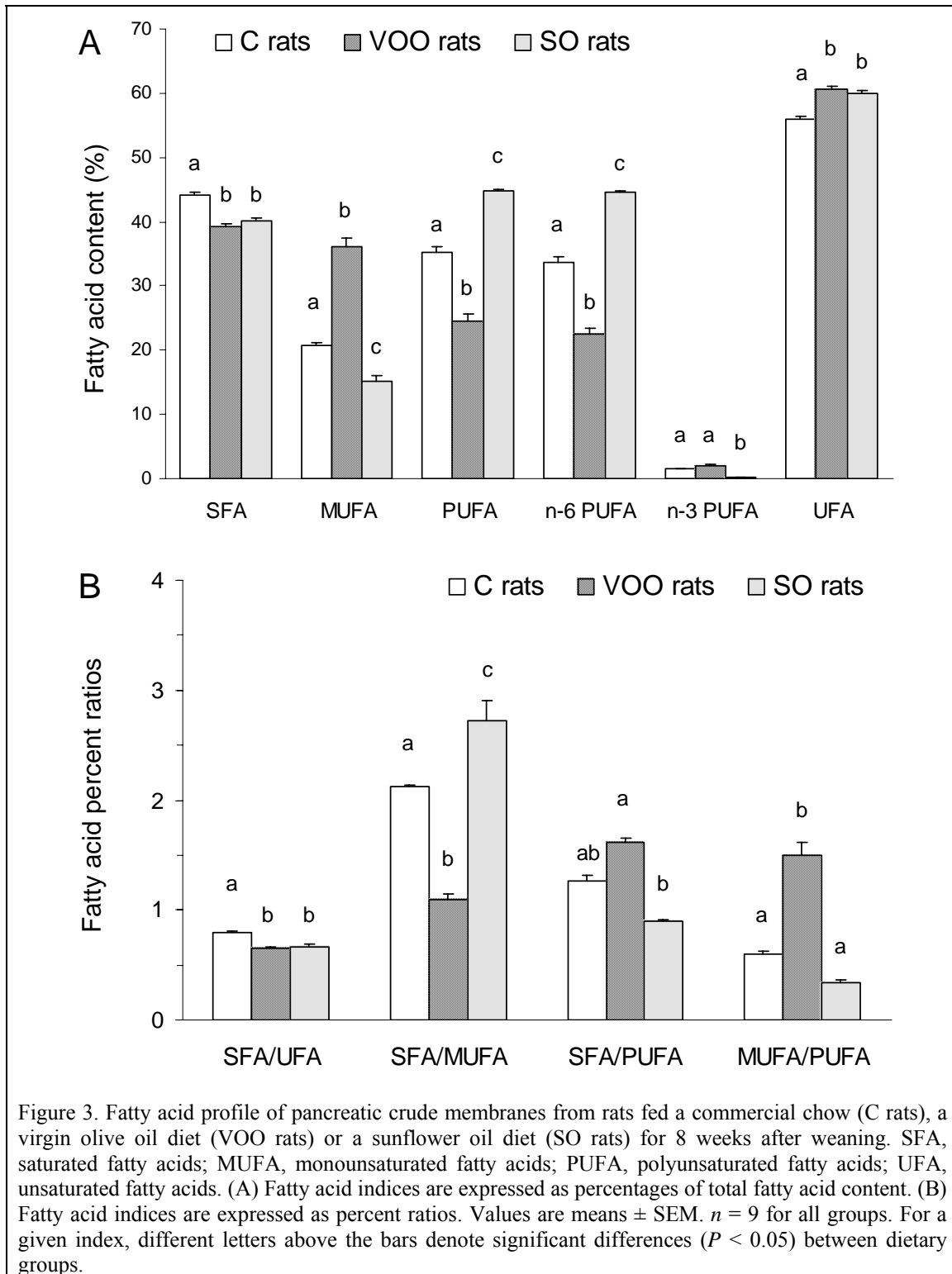
similar in C and SO rats. As summarized in Fig. 3A, feeding rats the SO diet instead of a commercial chow (C) increased n-6 PUFA in membranes, not only due to 18:2 n-6, the most abundant fatty acid in sunflower oil, but also through the contribution of its main metabolite, 20:4 n-6. The increase in n-6 PUFA (Fig. 3A) was achieved at the expense of SFA (16:0) and MUFA (16:1 n-7).

Table 3. Selected fatty acids in pancreatic membranes from rats fed a commercial chow (C), a virgin olive oil diet (VOO) or a sunflower oil diet (SO) for 8 weeks after weaning<sup>a</sup>

Fatty acid	C rats	VOO rats	SO rats
14:0	1.36 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.04 <sup>a</sup>
16:0	31.14 ± 0.32 <sup>a</sup>	27.01 ± 0.24 <sup>b</sup>	25.36 ± 0.20 <sup>c</sup>
16:1 n-7	5.45 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.84 ± 0.44 <sup>b</sup>	1.93 ± 0.17 <sup>b</sup>
18:0	10.07 ± 0.10 <sup>a</sup>	9.92 ± 0.30 <sup>a</sup>	12.26 ± 0.32 <sup>b</sup>
18:1 n-9	13.84 ± 0.30 <sup>a</sup>	32.41 ± 1.06 <sup>b</sup>	11.49 ± 0.72 <sup>a</sup>
18:2 n-6	14.52 ± 0.85 <sup>a</sup>	7.45 ± 0.14 <sup>b</sup>	22.21 ± 0.69 <sup>c</sup>
18:3 n-3	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>
20:4 n-6	18.10 ± 0.23 <sup>a</sup>	14.36 ± 0.93 <sup>b</sup>	21.46 ± 0.94 <sup>c</sup>
20:5 n-3	0.35 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>c</sup>
22:6 n-3	1.04 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Values are percentages of total fatty acid content (means ± SEM, *n* = 9 for all groups). For a particular row, values with different superscript letters are significantly different at *P* < 0.05.

Compared with the other two groups, VOO rats showed the highest values for 18:1 n9, MUFA and MUFA/PUFA, and the lowest values for SFA/MUFA. In turn, membranes prepared from SO rats displayed the highest values for 18:2 n-6, PUFA, n-6 PUFA and SFA/MUFA. The SFA/UFA ratio, which showed a mean value of 0.78 in rats fed a standard chow (C rats), was significantly reduced after intake of the VOO and SO diets (Fig. 3B), reaching comparable values of 0.65 and 0.67, respectively. It is interesting that, despite marked differences in the content of a number of individual fatty acids as well as in total MUFA and PUFA, the value for SFA/UFA was the same in VOO and SO animals.



### 3.4 Effect of supplementation of culture medium with 18:1 n-9 or 18:2 n-6 on the fatty acid profile of AR42J cells

Table 4 and Fig. 4 show the changes in membrane fatty acid composition of AR42J cells grown for 72 h with fetal calf serum (FCS) supplemented with either 18:1

n-9 (AR42J-O) or 18:2 n-6 (AR42J-L). Enrichment with those fatty acids profoundly influenced the fatty acid composition of AR42J cell membranes.

Table 4. Selected fatty acids in membranes from differentiated AR42J cells cultured for 72 h in medium containing unmodified serum (AR42J-C), serum enriched in 18:1 n-9 (AR42J-O) or serum enriched in 18:2 n-6 (AR42J-L)

Fatty acid	AR42J-C	AR42J-O	AR42J-L
14:0	3.40 ± 0.20 <sup>a</sup>	4.58 ± 0.08 <sup>b</sup>	4.43 ± 0.09 <sup>b</sup>
16:0	28.05 ± 0.21 <sup>a</sup>	27.39 ± 0.10 <sup>a</sup>	28.14 ± 0.38 <sup>a</sup>
16:1 n-7	3.47 ± 0.20 <sup>a</sup>	3.85 ± 0.19 <sup>a</sup>	3.70 ± 0.16 <sup>a</sup>
18:0	16.41 ± 0.26 <sup>a</sup>	12.35 ± 0.33 <sup>b</sup>	13.04 ± 0.30 <sup>b</sup>
18:1 n-9	25.69 ± 0.41 <sup>a</sup>	32.40 ± 1.11 <sup>b</sup>	15.95 ± 0.22 <sup>c</sup>
18:2 n-6	3.33 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.39 ± 0.03 <sup>a</sup>	17.03 ± 0.21 <sup>b</sup>
18:3 n-3	3.83 ± 0.20 <sup>a</sup>	5.11 ± 0.36 <sup>b</sup>	3.78 ± 0.24 <sup>a</sup>
20:4 n-6	3.80 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.86 ± 0.06 <sup>b</sup>
20:5 n-3	0.58 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.06 <sup>b</sup>
22:6 n-3	1.87 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.88 ± 0.07 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Values are percentages of total fatty acid content (means ± SEM).

AR42J-C: *n* = 18 (from 6 batches of cells); AR42J-O: *n* = 15 (from 5 batches); AR42J-L: *n* = 15 (from 5 batches).

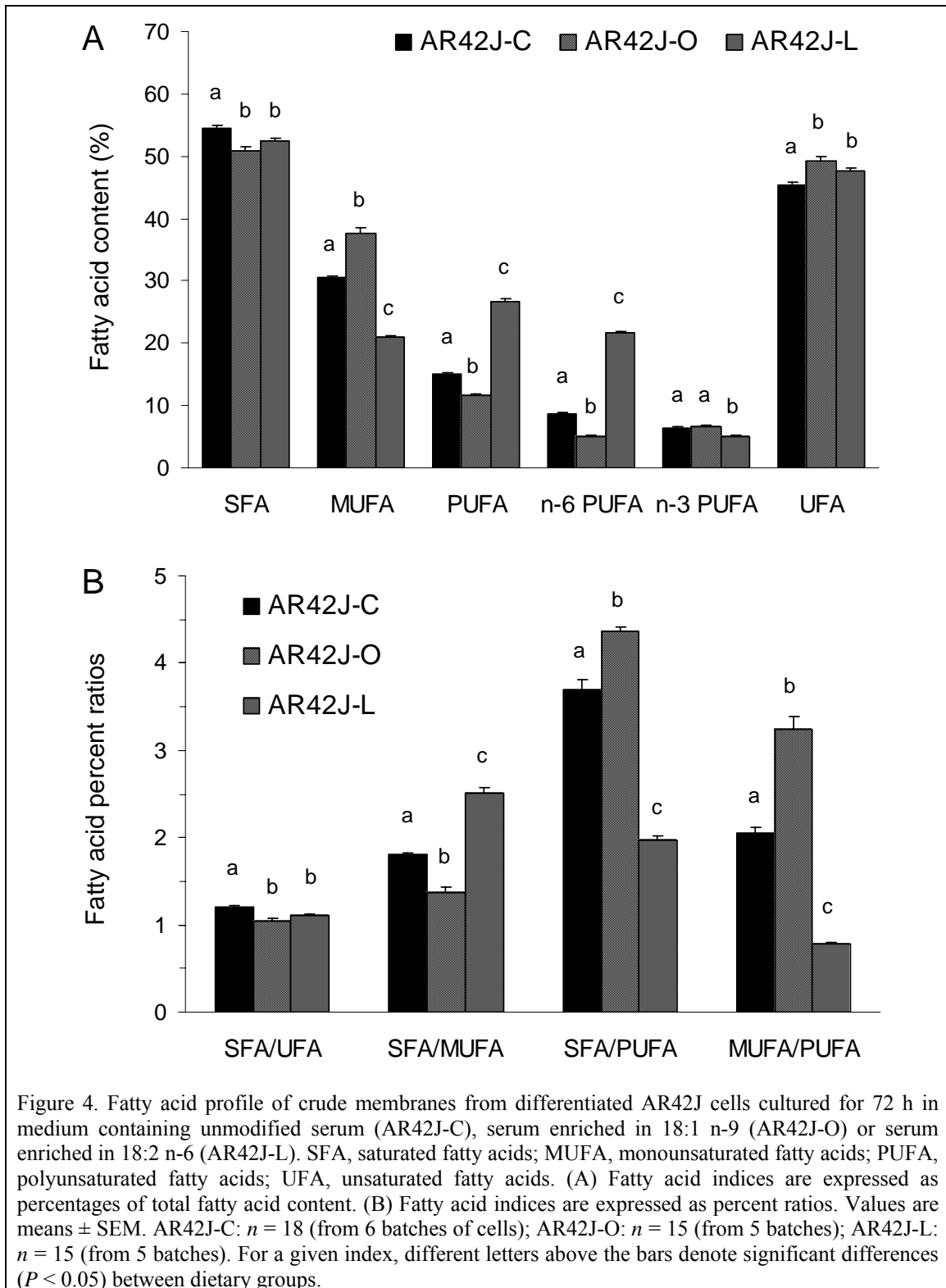
<sup>b</sup> For a particular row, values with different superscript letters are significantly different at *P* < 0.05.

Compared to control cells (AR42J-C), addition of 18:1 n-9 to culture medium (AR42JO) evoked a significant (*P* < 0.05) increase in the membrane content of 14:0, 18:1 n-9 and 18:3 n-3, and a significant (*P* < 0.05) decrease in 18:0, 20:4 n-6, 20:5 n-3 and 22:6 n-3. The proportion of 16:0, 16:1 n-7 and 18:2 n-6 did not vary among AR42J-O and AR42J-C cells (Table 4). Fatty acid indices (Fig. 4) summarize the effects of enrichment with 18:1 n-9. With this fatty acid in culture medium, the MUFA content of membranes increased significantly (due to 18:1 n-9) in comparison with control cells (AR42J-C), an increase that was compensated by a significant (*P* < 0.05) decrease in SFA (due to 18:0) and a significant decrease in n-6 PUFA (mainly due to 20:3 n-6 -data not shown- and 20:4 n-6).

Compared with cells grown in unmodified serum (AR42J-C), membranes of

cells cultured in the presence of 50  $\mu\text{M}$  18:2 n-6 showed a significant ( $P < 0.05$ ) increase in the proportion of 14:0 and 18:2 n-6, and a significant ( $P < 0.05$ ) decrease in 18:0, 18:1 n-9, 20:4 n-6, 20:5 n-3 and 22:6 n-3. Percent values of 16:0, 16:1 n-7 and 18:3 n-3 did not change (Table 4). Indices (Fig. 4) outline the changes in membrane fatty acids evoked by supplementation with 18:2 n-6. We can see that compared with control cells, AR42J-L suffered a large increase in n-6 PUFA (Fig. 4A). This increase was due to the incorporation of 18:2 n-6 itself, given that 18:2 n-6 metabolites either remained unchanged (20:3 n-6, data not shown) or even decreased significantly (20:4 n-6, see Table 4). Increase in n-6 PUFA was done at the expense of SFA (18:0) and MUFA (18:1 n-9).

In comparison with the remaining two treatments, the presence of 18:1 n-9 in the culture medium (AR42J-O) evoked in cells the highest values for 18:1 n-9, MUFA, MUFA/PUFA and SFA/PUFA, and the lowest values for SFA/MUFA. In turn, membranes prepared from AR42J-L cells showed the highest values for 18:2 n-6, PUFA, n-6 PUFA and SFA/MUFA, and the lowest values for SFA/PUFA and MUFA/PUFA. The effect of adding 18:1 n-9 or 18:2 n-6 was similar in that both fatty acids decreased the SFA/UFA ratio of AR42J-C cells to a comparable degree (Fig. 4B), from a mean value of 1.20 (AR42J-C) to 1.04 in AR42J-O and 1.10 in AR42J-L.



#### **4. Discussion**

Our previous experience with viable rat pancreatic acini (Yago *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2004; Yago *et al.*, 2006; Martínez-Burgos *et al.*, 2006) indicated that a cultured line of pancreatic acinar cells would be beneficial to completely understand the interactions between dietary lipids and the exocrine pancreas. For example, when working with the rat pancreas we observed that the yield of viable cells can be quite variable, which is likely due to the inability to rigidly control day-to-day differences in collagenase and mechanical digestion. Therefore, apart from other important advantages mentioned above (see the Introduction section), switching to a continuous cell line could result in easier preparation and greater reproducibility. A main goal of this research was to find a cell model for studies on the influence of changes in membrane lipid composition upon transduction pathways and cell function.

AR42J cells are widely used in exocrine pancreatic research. However, there have been no previous reports on their membrane fatty acid composition. As a first step in confirming the validity of this cell line for our purposes, we determined the fatty acid profile of crude membranes from AR42J cells and compared this profile to that from rat pancreas. Then we investigated whether these cells were able to adapt their membranes to medium lipids, i.e. whether the fatty acid composition of AR42J membranes could be modified by altering the fatty acids to which they were exposed.

The results of the current study showed marked differences in baseline fatty acid profiles of membranes from rat pancreas and AR42J cells. Differences concerned not only major fatty acids (which, in addition, were not coincident) but also minor fatty acids and fatty acid indices. Initially, this could be explained by variations in the quantity of fatty acids in the extracellular environment. In this sense, we should note here that the lipid composition of the rat chow and fetal calf serum (FCS) differed widely. Membrane fatty acids in AR42J-C cells correlated closely with the amount available in our culture medium, with proportions of SFA, MUFA, PUFA and most individual fatty acids reflecting to a high degree those in serum. This confirms the findings in other mammalian cells (Spector *et al.*, 1980) that fatty acid *de novo* synthesis is inhibited when the culture medium contains an adequate supply of fatty acids. Under these conditions, most cellular fatty acids seem to be derived directly from

the material that is taken up from the extracellular medium.

In contrast to AR42J-C cells, fatty acids in pancreatic membranes from rats fed the standard chow (C rats) reflected dietary lipid composition but not with such fidelity. Indeed, apart from a clear influence of age, physiological state and tissue (Mataix *et al.*, 1998; Soriguer *et al.*, 2000), many *in vivo* studies have indicated that adaptation of biological membranes to dietary fat type does not depend only on fatty acid availability, since changes in the dietary fat consumed do affect the rate of phospholipid synthesis *de novo*, the redistribution of fatty acyl chains and the activity of desaturases and elongases (for a review, see Clandinin *et al.*, 1991). Unsaturation of fatty acyl chains is a major determinant of the physical properties of biological membranes. A main feature of membrane lipid composition that determines membrane fluidity is the ratio of saturated to unsaturated fatty acids (SFA/UFA). Optimal SFA/UFA ratio in mammalian plasma membranes is 1:1 (Thewke *et al.*, 2000) and it is desaturases, at least in part, that work to maintain this ratio within certain limits. The commercial chow given in our study to C rats was very rich in unsaturated fatty acids (SFA/UFA of approx. 0.4). Membrane data in this group of animals show how the physiological mechanisms work to cause a decrease in UFA and an increase in SFA (compared to chow composition) in such way that a SFA/UFA ratio of approx. 0.8 is achieved in pancreatic membranes. Together with a modest MUFA percent, the high content of 16:0 and 18:0 in C rat membranes suggest down-regulation of  $\Delta 9$  desaturase by abundant linoleic acid in chow (Ntambi, 1999), with the subsequent accumulation of substrate. Contrary to MUFA and SFA, the proportion of total PUFA in membranes from C rats was similar to that in chow, with the particularity that 18:2 n-6, the major PUFA in diet (34.49%), was not preserved in pancreatic membranes (approx. 14%). Rather, the current results are indicative of efficient conversion of dietary 18:2 n-6 into 20:4 n-6, which accounted for approx. 18% of membrane fatty acids.

As previously observed by us (Yago *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2003), adaptation of weaning rats to diets enriched in virgin olive oil (VOO) or sunflower oil (SO) affected markedly in this study the fatty acid composition of pancreatic membranes. Thus, membranes in the VOO group were characterized by significantly higher levels of 18:1 n-9 and total MUFA compared with the other groups. In turn, consumption of the SO diet increased the proportion of n-6 PUFAs such as 18:2 n-6 and 20:4 n-6.

Membranes from both VOO and SO rats had a significantly lower SFA/UFA ratio compared to C rats. Still, SFA/UFA values kept within physiological limits ( $> 0.6$ ), which suggest that membranes display a good degree of homeostasis in relation to this parameter, with increases of several major fatty acids being always balanced by a change in the level of other fatty acids.

A main objective of this work was to examine the validity of differentiated AR42J cells as a model to study the interactions between lipids and pancreatic acinar cell function. To fulfil this aim, we had to confirm i) that the fatty acid composition of AR42J cells could be modified, and ii) that similar compositional variations that can be evoked in rats when dietary fat type is altered occurred in AR42J cells. We now communicate for the first time that the fatty acid composition of crude membranes from AR42J cells can be altered in culture by adding specific fatty acids to the usual growth medium for 72 h. We included major fatty acids abundant in olive oil (18:1 n-9) and sunflower oil (18:2 n-6), that have been shown to alter pancreatic function in our previous *in vivo* and *in vitro* studies (Yago *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2003). Compared with cells grown in standard conditions (AR42J-C cells), addition of 18:1 n-9 to the culture medium (AR42J-O cells) increased significantly the proportion of this fatty acid in the membrane fraction, and 18:2 n-6 supplementation (AR42J-L cells) of the culture produced a significant increase in the 18:2 n-6 content.

A number of techniques have been developed for modifying the fatty acid composition of cells in culture. Fatty acids are toxic in the unbound form and are also very poorly soluble in water, so they are usually provided in the bound form (either to albumin or other protein) or in the form of liposomes. The most widely used method consists of the preparation of a fatty acid-BSA complex that is then added to serum-free (Ding & Mersmann, 2001) or serum-containing (Mishra & Simonson, 2005) media. Given that our protocol did not consider removing serum from the culture medium, we bound fatty acids directly to serum proteins. The method is simple and rapid, and did not appear to alter the main characteristics of the culture. Fatty acid-supplemented and unsupplemented AR42J cells had similar growth patterns and degrees of differentiation. Our data in AR42J cells also indicate that the fatty acid delivery system, that was chosen to mimic physiological conditions and to avoid damaging effects of free fatty acids or solvents, is very effective in modifying membrane fatty acids in this cell model,



since extensive changes were produced in 72 h exposure. Moreover, the concentration of added fatty acids in the culture medium (50  $\mu M$ ) was selected to approximate physiological concentrations. The total plasma free fatty acid concentration in the fed state is approximately 0.3 mM, so concentrations of individual fatty acids are expected to be in the range of 30-130  $\mu M$  (Calder *et al.*, 1990).

Until now, no study has existed about the influence of changes in the extracellular lipid composition on membrane fatty acid profile of AR42J cells. Our results show that this cell line is very responsive to such changes and this has a first obvious implication. Given that the fatty acid composition of different kinds of commercially available serum differs widely (Stoll & Spector, 1984), the fact that the membrane profile is likely to change should be taken into account when changes are contemplated in the serum used to grow AR42J pancreatic cells.

In the current study, the addition of 18:1 n-9 or 18:2 n-6 to the culture medium for 72 h profoundly influenced the fatty acid composition of AR42J cell membranes. Importantly, despite some differences in magnitude, the pattern and direction of changes was parallel to that found in rats fed virgin olive oil or sunflower oil (best illustrated in Fig. 3 and 4). For example, compared with baseline situation (C rats and AR42J-C cells) both virgin olive oil in rats and 18:1 n-9 in cells evoked a significant increase in membrane MUFA (due to 18:1 n-9) at the expense of SFA and PUFA. We also observed that both sunflower oil in rats and 18:2 n-6 in AR42J cells produced significant increases in total and n-6 PUFA at the expense of SFA and MUFA. Variations in the other fatty acid indices, including the SFA/UFA ratio, followed the same trend after feeding oils *in vivo* or growing the cells with the respective major fatty acid.

There is only one remarkable difference between rat pancreas and AR42J cells in their ability to adapt to environmental fatty acids and it concerns 20:4 n-6. The enrichment of standard serum with 18:2 n-6 did not produce the expected increase in the 20:4 n-6 content of AR42J phospholipids. It is unknown whether the failure of these cells to accumulate 20:4 n-6 under our experimental conditions is due to an intrinsic inability of the cell to store an increased amount of 20:4 or, more likely, if these cells express a low desaturase activity, as shown by some continuously cultured cell lines

(Yoo *et al.*, 1980; Kaduce *et al.*, 1982). Not only 20:4 n-6 did not increase, but it actually decreased in AR42J-L cells compared with those cultured with standard serum. Two factors may be responsible for this decrease and both could operate concurrently. One is that the cell has a limited capacity to convert 18:2 n-6 to 20:4 n-6. The other is that the incorporation of 20:4 n-6 into membrane phospholipids is reduced as the availability of 18:2 n-6 increases, presumably through competitive inhibition. Studies are being conducted in our laboratory to make clear this fundamental point. Preliminary results of time-course experiments (unpublished information) show that the membrane levels of 20:4 n-6 in AR42J cells are similarly low regardless of whether 18:2 n-6 is added to the medium for 72 h or 144 h. Nevertheless, the results of the present work indicate that this characteristic of AR42J cells should be taken into account, especially when using this line as a cellular model for pancreatitis studies, given the role of 20:4 n-6 in eicosanoid synthesis.

To summarize, the present work reveals the existence of significant differences between the membrane fatty acid profile of AR42J cells cultured with intact fetal calf serum and that of pancreas from rats fed a standard chow for this species. Supplementation of culture media with 18:1 n-9 or 18:2 n-6 changed in 72 h the fatty acid spectrum of AR42J cells and, despite some differences in magnitude, the pattern and direction of changes was parallel to that found in rats fed diets enriched, respectively, in virgin olive oil or sunflower oil. A largely different content in 20:4 n-6 observed in membranes from rat pancreas and AR42J cells upon enrichment of diet and culture medium, respectively, with 18:2 n-6 might account for the role played by the liver in the rat.

Overall, our results suggest that the AR42J cell line can be a useful tool to assess the effects of specific membrane compositional changes on acinar cell function and signalling. However, because of differences in baseline characteristics, and perhaps fatty acid metabolism, we believe that *in vitro* work with this cell line is no substitute for *in vivo* studies. Thus, although research with AR42J cells can possibly save time, money and, more importantly, animals, we encourage other scientists to confirm results obtained in AR42J cells with experiments *in vivo*, because there can be no doubt that the whole animal is the “gold” pattern to corroborate the events described at the cellular level.

## Acknowledgements

We thank the Junta de Andalucía for personal support of N Audi and MD Yago, and the University of Granada for personal support of MD Mesa and MA Martínez.

## **5. References**

Bozem M, Kuhlmann S, Blum R, Feick P, Schulz I. Hormone-stimulated calcium release is inhibited by cytoskeleton-disrupting toxins in AR4-2J cells. *Cell Calcium* 28:73-82, 2000.

Calder PC, Bond JA, Harvey DJ, Gordon S, Newsholme EA. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochem J* 269:807-814, 1990.

Chapkin RS, Hong MY, Fan YY, Davidson LA, Sanders LM, Henderson CE, Barhoumi R, Burghardt RC, Turner ND, Lupton JR. Dietary n-3 PUFA alter colonocyte mitochondrial membrane composition and function. *Lipids* 37:193-199, 2002.

Chow SC, Sisfontes L, Jondal M, Bjorkhem I. Modification of membrane phospholipid fatty acyl composition in a leukemic T cell line: effects on receptor mediated intracellular  $Ca^{2+}$  increase. *Biochim Biophys Acta* 1092:358-366, 1991.

Clandinin MT, Cheema S, Field CJ, Garg ML, Venkatraman J, Clandinin TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J* 5:2761-2769, 1991.

Diaz RJ, Yago MD, Martinez-Victoria E, Naranjo JA, Martinez MA, Mañas M. Comparison of the effects of dietary sunflower oil and virgin olive oil on rat exocrine pancreatic secretion in vivo. *Lipids* 38:1119-1126, 2003.

Dietrich JB. AR4-2J cells: a model to study polypeptide hormone receptors. *Biosci Rep* 16:273-288, 1996.

Ding S, Mersmann HJ. Fatty acids modulate porcine adipocyte differentiation and transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic proteins. *J Nutr Biochem* 12:101-108, 2001.

Feick P, Gilhaus S, Blum R, Hofmann F, Just I, Schulz I. Inhibition of amylase secretion from differentiated AR4-2J pancreatic acinar cells by an actin cytoskeleton controlled protein tyrosine phosphatase activity. *FEBS Lett* 451:269-274, 1999.

Ferreira L, Perez-Gonzalez N, Llanillo M, Calvo JJ, Sanchez-Bernal C. Acute pancreatitis decreases pancreas phospholipid levels and increases susceptibility to lipid peroxidation in rat pancreas. *Lipids* 37:167-171, 2002.

Hsu S, Schmid A, Sternfeld L, Anderie I, Solis G, Hofer HW, Schulz I. Tyrosine phosphatase PTP1B modulates store-operated calcium influx. *Cell Signal* 15:1149-1156, 2003.

Ikeda Y, Fukuoka S. Phosphatidic acid production, required for cholecystokinin octapeptide-stimulated amylase secretion from pancreatic acinar AR42J cells, is regulated by a wortmannin-sensitive process. *Biochem Biophys Res Commun* 306:943-947, 2003.

Kaduce TL, Spector AA, Bar RS. Linoleic acid metabolism and prostaglandin production by cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *Arteriosclerosis* 2:380-389, 1982.

Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27:114-120, 1986.

Martinez MA, Lajas AI, Yago MD, Redondo PC, Granados MP, Gonzalez A, Rosado JA, Martinez-Victoria E, Mañas M, Pariente JA. Dietary virgin olive oil enhances secretagogue-evoked signalling in rat pancreatic acinar cells. *Nutrition* 20:536-541, 2004.

Martinez MA, Yago MD, Lajas AI, Pariente JA, Martinez-Victoria E, Mañas M. Dietary fatty acids modify membrane lipid composition in rabbits with experimental atherosclerosis. Is this fact involved in the enzymatic secretion pattern? *J Physiol* 548:3P-4P, 2003.

Martinez-Burgos MA, Granados MP, Gonzalez A, Rosado JA, Yago MD, Salido GM, Martinez-Victoria E, Mañas M, Pariente JA. Involvement of ryanodine-operated channels in tert-butylhydroperoxide-evoked Ca<sup>2+</sup> mobilisation in pancreatic acinar cells. *J Exp Biol* 209:2156-2164, 2006.

Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mañas M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 24:511-521, 1998.

Mishra R, Simonson MS. Saturated free fatty acids and apoptosis in microvascular mesangial cells: palmitate activates pro-apoptotic signaling involving caspase 9 and mitochondrial release of endonuclease G. *Cardiovasc Diabetol* 4:2, 2005.

Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 40:1549-1558, 1999.

Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J. Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat. *J Bioenerg Biomembr* 33:127-134, 2001.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123:1939-1951, 1993.

Renau J, Megias L. Manual de técnicas de microscopía electrónica (M.E.T.). Aplicaciones biológicas. Granada, Spain: Editorial Universidad de Granada, 1998.

Satoh A, Gukovskaya AS, Edderkaoui M, Daghighian MS, Reeve JR Jr, Shimosegawa T, Pandol SJ. Tumor necrosis factor-alpha mediates pancreatitis responses in acinar cells via protein kinase C and proline-rich tyrosine kinase 2. *Gastroenterology* 129:639-651, 2005.

Simeone DM, Yule DI, Logsdon CD, Williams JA. Ca<sup>2+</sup> signaling through secretagogue and growth factor receptors on pancreatic AR42J cells. *Regul Pept* 55:197-206, 1995.

Song JY, Lim JW, Kim H, Morio T, Kim KH. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. *J Biol Chem* 278:36676-36687, 2003.

Soriguer FJ, Tinahones FJ, Monzon A, Pareja A, Rojo-Martinez G, Moreno F, Esteva I, Gomez-Zumaquero JM. Varying incorporation of fatty acids into phospholipids from muscle, adipose and pancreatic exocrine tissues and thymocytes in adult rats fed with diets rich in different fatty acids. *Eur J Epidemiol* 16:585-594, 2000.

Spector AA, Mathur SN, Kaduce TL, Hyman BT. Lipid nutrition and metabolism of cultured mammalian cells. *Prog Lipid Res* 19:155-186, 1980.

Stoll LL, Spector AA. Changes in serum influence the fatty acid composition of established cell lines. *In vitro* 20:732-738, 1984.

Thewke D, Kramer M, Sinensky MS. Transcriptional homeostatic control of membrane lipid composition. *Biochem Biophys Res Commun* 273:1-4, 2000.

Vajreswari A, Narayanareddy K. Effect of dietary fats on some membrane-bound enzyme activities, membrane lipid composition and fatty acid profiles of rat heart sarcolemma. *Lipids* 27:339-343, 1992.

Yago MD, Diaz RJ, Martinez MA, Audi N, Naranjo JA, Martinez-Victoria E, Mañas M. Effects of the type of dietary fat on acetylcholine-evoked amylase secretion and calcium mobilization in isolated rat pancreatic acinar cells. *J Nutr Biochem* 17:242-249, 2006.

Yago MD, Diaz RJ, Ramirez R, Martinez MA, Mañas M, Martinez-Victoria E. Dietary-induced changes in the fatty acid profile of rat pancreatic membranes are associated with modifications in acinar cell function and signalling. *Br J Nutr* 91:227-234, 2004.

Yoo TJ, Chiu HC, Spector AA, Whiteaker RS, Denning GM, Lee NF. Effect of fatty acid modifications of cultured hepatoma cells on susceptibility to complement-mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 40:1084-1090, 1980.

Yu JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. NADPH oxidase mediates interleukin-6 expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1458-1469, 2005.



**Effects of dexamethasone and exposure period to  
different fatty acids in the culture medium on  
adaptation of membrane lipid profile and amylase  
secretion**

**\*AUDI N, †MESA MD, \*SANTANA C, \*LÓPEZ-MILLÁN MB,  
\*MARTÍNEZ-BURGOS MA, \*MAÑAS M, \*MARTÍNEZ-VICTORIA E,  
\*YAGO MD.**

*\*Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology, University of  
Granada, C/ Ramón y Cajal 4, 18071 Granada, Spain*

*†Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Nutrition and Food  
Technology, University of Granada, C/ Ramón y Cajal 4, 18071 Granada, Spain*



## **1. Introduction**

The pancreatic tumoral cell line AR42J has been widely used as an *in vitro* model of the exocrine pancreas to study secretion (Elinson *et al.*, 2006; Bose *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2005; De Lisle *et al.*, 2005); signal transduction (Regimbald-Dumas *et al.*, 2007; Damm *et al.*, 2004); cytoskeleton function (Satoh *et al.*, 2005); pancreatitis (Yu *et al.*, 2006; Rizvi *et al.*, 2006; Gaiser *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2002; Motoo *et al.*, 2001) and apoptosis (Voisin *et al.*, 2006; Landau *et al.*, 2006; Gebhardt *et al.*, 2004).

Several authors use these cells as a model of pancreatic acinar cell, but AR42J cells possess not only exocrine properties but also combine neuroendocrine properties (Rosewicz *et al.*, 1992). They differ from normal acinar cells for at least three reasons (Christophe J., 1994): 1) they proliferate rapidly; 2) they synthesize, store, and secrete digestive enzymes but the regulation of their exocrine function is abnormal, and 3) they possess an added neuroendocrine-regulated pathway. For this reason, some authors carry out their studies in AR42J cells treated with dexamethasone; this glucocorticoid favours their differentiation toward the exocrine phenotype. Logsdon *et al.* (1985) described that after 48 h of dexamethasone treatment the cellular content of amylase increase eightfold; this effect of dexamethasone was discernible after 12 h of incubation and approached maximal stimulation after 72 h of incubation. The increases in cellular amylase content were due to increased amylase mRNA and amylase synthesis. Logsdon *et al.* (1985) also described that dexamethasone treatment led to increased secretion of amylase in response to the secretagogue cholecystokinin (CCK), Logsdon (1986) data indicate that glucocorticoids induce an increase in the number of CCK receptors in AR42J cells, and this increase leads to enhanced sensitivity to CCK.

CCK is a brain-gut peptide; it functions both as a neuropeptide and as a gut hormone (Crawley & Corwin, 1994; Noble *et al.*, 1999). Although the pancreas and the gallbladder were long thought to be the principal peripheral targets of CCK, CCK receptors are found throughout the gut. The actions of CCK include stimulation of exocrine and endocrine secretion, motility and growth in the gastrointestinal tract, and regulation of satiety, anxiety, pain and behavior in the central and peripheral nervous systems (Varga *et al.*, 2004).

CCK, initially characterized as a 33-amino-acid peptide, is present in a variety of biologically active molecular forms, all derived from a 115-amino-acid precursor prepro-CCK (Deschenes *et al.*, 1984). They include CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-22, sulfated CCK-8 and CCK-7, unsulfated CCK-8 and CCK-7, CCK-5, and CCK-4 (Rehfeld & Hansen, 1986). All of these, as well as the closely related peptide gastrin and the amphibian skin peptide caerulein, share a common amidated tetrapeptide Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> at the C-terminal. Within the CCK/gastrin family of peptides, the characteristic CCK-like activity depends on the sulfated Tyr residue at the seventh position. If the Tyr residue is not sulfated, or if another amino-acid residue is present at this location, the peptide behaves as a gastrin analogue and loses its CCK-like potency by a factor of about 1000 (Wank, 1998).

The biological actions of CCK are mediated by two distinct receptors originally denoted CCK-A (where 'A' indicated alimentary type) and CCK-B ('B' for brain type), based on their anatomical location. They are now termed CCK1 and CCK2, respectively, because of evidence indicating overlapping areas of localization (Noble *et al.*, 1999).

The CCK1 receptor has an approximately 1000-fold greater affinity for CCK than for gastrin, while the CCK2 receptor has the same high affinity for both CCK and gastrin. In addition, while the CCK1 receptor responds to sulfated CCK with a 1000-fold greater potency than non-sulfated CCK, the CCK2 receptor does not discriminate between the two (Noble *et al.*, 1999). The CCK1 receptor, like the CCK2 receptor, belongs to the class A, rhodopsin-like family of G-protein-coupled receptors (Archer *et al.*, 2003).

Multiple subtypes of the CCKA receptors have been postulated to account for the differences in pharmacology or affinity cross-linking of CCKA receptors between pancreas and gallbladder and the presence of high and low affinity CCKA receptors on pancreatic acini. Multiple subtypes of the CCKB receptor have been postulated to explain the differences in pharmacology and physiology between gastric and gallbladder smooth muscle. The CCKA and CCKB receptors are 48% homologous and constitute a family of receptors within the guanine nucleotide-binding regulatory protein-coupled

superfamily of receptors. Wank *et al.* (1994) observed that each receptor is highly conserved between rat, guinea pig, and human. Not only cDNA encoding, but also differences in tissue and species-specific posttranslational processing, receptor coupling, and associated membrane protein and lipid heterogeneity may be among some of the other factors that may account for the phenotypic expression of more receptor subtypes (Wank *et al.*, 1994).

In general, a relationship can be established between the ability of a particular CCK-related peptide to inhibit binding of [<sup>125</sup>I]CCK-8 and its ability to alter acinar cell function. One characteristic feature of the dose-response curve for the ability of CCK-8 to inhibit binding of [<sup>125</sup>I]CCK-8 is that the curve is broad: the maximally effective concentration of CCK-8 is at least 1000 times greater than the threshold concentration. This broad dose-inhibition curve can be resolved into two components, which most investigators interpret to reflect two different classes or states of CCK receptors. Since acinar cells clearly have two classes of receptors, irrespective of whether these classes reflect different states of different molecular entities, we use the term “classes”. One class of CCK receptors has a high affinity and a low capacity for CCK-8, whereas the other class has a low affinity and a high capacity for CCK-8 (Sankaran *et al.*, 1982; Wank *et al.*, 1988).

In rat pancreatic acinar cells, amylase release and Ca<sup>2+</sup> mobilization are related to the occupancy of CCKA receptor. The rat pancreatic acinar cell line AR42J possesses both CCKA (CCKA R) and CCKB (CCKB R) sub-type receptors. Bertrand *et al.* (1994) showed on AR42J cells that: a minority of CCKA R (K<sub>d</sub> = 0.7 nM), a classical CCKB R (K<sub>d</sub> = 0.93 nM) and a new high affinity gastrin binding site (K<sub>d</sub> = 2.1 pM) coexisted; CCK through CCKA R and CCKB R, was more potent to stimulate amylase secretion (EC<sub>50</sub> = 34 pM) and Ca<sup>2+</sup> mobilization (EC<sub>50</sub> = 30 pM) than to occupy its receptor.

If treatment with dexamethasone changes significantly the functionality of AR42J cells in relation to amylase release, it is impossible to compare studies apparently similar but carried out with or without a previous dexamethasone treatment.

Besides, it exists also controversy over the effects of dexamethasone on the phospholipids fatty acid profile, probably because of that the studies have been carried

out in different animal and cellular models and different protocols have been used. Dexamethasone induced gastric ulceration was associated, in part, with changes in the phospholipid fatty acid profile (Manjari V & Das UN, 2000). It is known that glucocorticoids increase the sugar and lipid uptake in adult animals, Iordache *et al.* (2005) demonstrated that dexamethasone reduced in some tissues lipid uptake in suckling and weanling rats. Thiesen *et al.* (2003) studied the dietary lipids alteration of the effect of steroids on transport of glucose after intestinal resection. Letteron *et al.* (1997) demonstrated that glucocorticoids inhibit medium- and short-chain acyl-CoA dehydrogenation and hepatic lipid secretion in mice. Dexamethasone pretreatment of ischemic myocardium resulted in dramatic inhibition of phospholipase A2 activity accompanied by a reduction in arachidonic acid (AA) and total free fatty acid levels (Engelman *et al.*, 1989). Medow *et al.* (1989) studies have shown that treatment of cultured rabbit coronary microvessel endothelial cells with dexamethasone did not significantly alter the relative distribution of membrane phospholipids but did result in changes of fatty acid composition. The role of dexamethasone in the regulation of lipid metabolism was examined in Caco-2 cells during development of their enterocyte phenotype, treatment of differentiated cells with dexamethasone increased their cholesteryl esters content but no effect was identified upon other lipids, their fatty acid composition and on the incorporation of [<sup>3</sup>H]AA (Jindrichova *et al.*, 2003). No significant change was observed in fatty acid components of the phospholipids of epididymal fat cells from adrenalectomized rats incubated with dexamethasone (Murray *et al.*, 1979).

On the other hand, in the early 1900s Pavlov observed that the pancreas, like most other organs of the body, possesses the power of adaptation to varying conditions, and that the composition of pancreatic juice is not constant, but can be modified by different diets, particularly with respect to the amounts of the enzymes which it contains. It has been revealed in different tissues that dietary fatty acids influence both stored and structural lipids, which in turn alter several physiological functions such as the physical state of the membrane (fluidity), hormone binding, signal transduction (Murphy MG, 1990) and eicosanoid production (Smith WL, 1989). Our group has demonstrated in dogs the existence of a clear influence of the amount and type of dietary fat upon the pancreatic response to food, without ruling out a role for the duration of the adaptation period (Yago *et al.*, 1997).

Changes in fatty acid profile of phospholipids in both cellular and subcellular membranes (Quiles *et al.*, 1999; Clandinin *et al.*, 1991; Vajreswari & Narayanareddy, 1992) of different organs influenced by the dietary fat composition can be quite fast. In the newly weaned rat pups, diets containing 20% (w/w) fat from different sources affected the fatty acid composition of intestinal brush border membranes after only 40 h of feeding (Wang *et al.* 1996), and the effects of coconut, olive or sunflower oil diets (10% w/w) were evident in liver microsomes (Giron *et al.* 1996) after 6 days. A period of 6 weeks has been found to be enough to induce changes in adipocyte plasma membrane of weanling rats (Field *et al.* 1989) and some reports (Suarez *et al.* 1996a,b) indicate that the rat kidney, lung and erythrocytes are also responsive to modifications in dietary fatty acids during early postnatal life (4–6 weeks after weaning). Differences in fatty acid profile seem to be permanent provided the animals are kept on the same dietary treatment (Wang *et al.*, 1996), but the effects can be changed back to the original situation by refeeding the former diet (Innis & Clandinin, 1981).

For other tissues such as the brain, skeletal muscle and heart, a great variability has been reported in their sensitivity to dietary changes (Quiles *et al.*, 1999; Suarez *et al.*, 1996a, 1996b; Abedin *et al.*, 1999; Moussa *et al.*, 1996), which probably reflects the influence of the antecedent diet (Berlin *et al.*, 1998), age, percentage and type of dietary fat and duration of the feeding period.

We have confirmed that the type of dietary fat influences the fatty acid composition of pancreatic membranes (Audi *et al.*, 2007; Yago *et al.*, 2006, 2004; Martinez *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2003) and this may, in turn, influences acinar cell content and function. Recently, we have demonstrated that rat pancreatic acinar cell line AR42J adapts its membranes after exposure to different fatty acids (18:1 n-9 or 18:2 n-6) in the culture medium and we have compared this adaptation to that occurs in rat exocrine pancreas when dietary fat intake is modified (Audi *et al.*, 2007).

AR42J cell line is a useful tool to assess the effect of membrane compositional changes on acinar cell function (Audi *et al.*, 2007). Our aim in this study was to investigate if the differentiation of AR42J cells with 100nM of dexamethasone for 72 h is relevant and if it modifies the biologic response. We also aim study if dexamethasone

changes the adaptation process of fatty acid profile of AR42J cell membranes exposed to different fatty acids in the culture medium, and if dexamethasone affects the functional adaptation to different fatty acids added. Simultaneously, we analyze in AR42J cells exposed to different fatty acids in the culture medium if, like in *in vivo* animal, the changes in membrane profile and secretion of enzymes depend on the adaptation period. It is important to know the influence of both factors, dexamethasone and time of exposure to fatty acids, on the composition of membranes and if these modifications were accompanied by a change in the secretory activity stimulated by cholecystinin-octapeptide (CCK-8).

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Cultivo Celular**

Las células AR42J se cultivaron en las condiciones que se especifican en el apartado general de Materiales y Métodos (ver página 29). De acuerdo a los distintos objetivos planteados en el diseño experimental, las células AR42J fueron sometidas a los siguientes tratamientos de forma individual o combinados:

- a) Tratamiento de 72 h con 100 nM de dexametasona (+DX) adicionada al medio de cultivo para inducir la diferenciación hacia el fenotipo exocrino (Bozem *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2003).
  
- b) Tratamiento con los ácidos grasos (AG) oleico (18:1 n-9) o linoleico (18:2 n-6) para inducir la modificación de los AG de las membranas celulares. Este tratamiento se realizó siguiendo un protocolo sencillo basado en una modificación del método de Chow *et al* (1991) En resumen, se enriqueció el suero fetal bovino (FCS) con 18:1 n-9 o 18:2 n-6 por adición del volumen necesario de las soluciones madre (100 mM en etanol absoluto). Esta mezcla se equilibró durante 1 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Durante este tiempo, se aplicaron 3 pulsos de sonicación de 30 s cada uno para facilitar la unión del AG a las proteínas del FCS. Este suero una vez enriquecido con 18:1 n-9 o 18:2 n-6 se adicionó entonces al medio base (RPMI-1640). La concentración final en el medio de cultivo de los AG adicionados fue de 50 µM. Los AG se obtuvieron de Sigma-Aldrich y eran puros al 99% y aptos para cultivos celulares. Se comprobó que el pH del medio no se alteraba por la adición del suero enriquecido en AG. La viabilidad de células suplementadas y no suplementadas con AG fue del 95%–98% de acuerdo con el método de exclusión del *trypan blue*. Este tratamiento se aplicó durante 72 h (3 días) o 144 h (6 días); en este último caso se renovó el medio a las 72 h.

En definitiva en este trabajo hemos analizado diez grupos experimentales de células AR42J sometidas a distintos tratamientos:

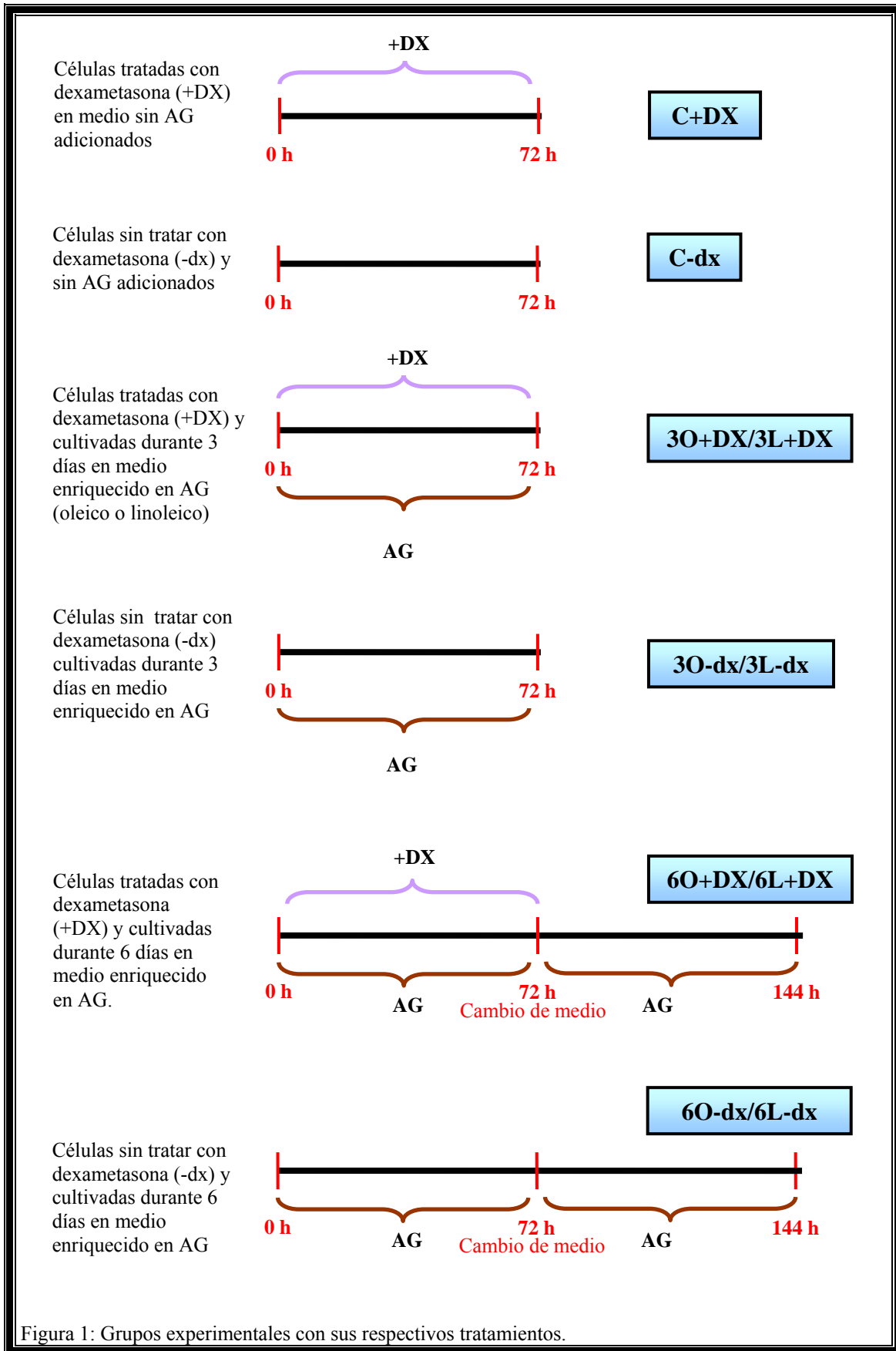


Figura 1: Grupos experimentales con sus respectivos tratamientos.



## **2.2 Obtención y Análisis de Membranas de Células AR42J**

Tras cada uno de los tratamientos descritos se obtuvieron y analizaron las membranas celulares según se detalla en el apartado general de Materiales y Métodos (ver página 29) y se resume en el artículo anterior (Audi *et al.*, 2007).

## **2.3 Microscopía Electrónica de Transmisión**

Células de la línea celular AR42J tratadas con dexametasona (+DX) o sin tratar con este glucocorticoide (-dx) se sometieron al protocolo que se detalla en el apartado general de Materiales y Métodos (ver página 29) y en Audi *et al.* (2007).

## **2.4 Secreción de Amilasa**

Tras cada uno de los diez tratamientos diferentes descritos, las células se incubaron a 37 °C durante 50 min con medio de incubación (basal) o con el octapéptido de colecistoquinina (CCK-8) a distintas concentraciones ( $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M) y se analizó la actividad amilásica basal (% total) y la secreción neta estimulada de amilasa (% total) de acuerdo con el apartado general de Materiales y Métodos (ver página 32).

## **2.5 Cálculos y Análisis Estadístico**

El índice de instauración (UI) se calculó según la fórmula:

$$UI = (\Sigma (\text{contenido en ácidos grasos} \times \text{número de dobles enlaces})) / \text{contenido total en ácidos grasos saturados (SFA)}$$

A no ser que se indique lo contrario, los resultados en el texto, tablas y gráficas se expresan como media  $\pm$  E.E.M. Para las variables con una distribución normal, se aplicó el test de Levene de homogeneidad de varianzas, examinándose posteriormente las diferencias entre los diferentes grupos mediante un ANOVA de una vía (Procedimiento one-way de SPSS), utilizando como test a posteriori (*post hoc*) el de la Diferencia Menos Significativa (Least Significant Difference, LSD), y el de Tukey's

HSD (honestly significant difference) cuando la variable independiente tenía más de 2 categorías.

También se realizó un análisis factorial (procedimiento modelo lineal general, univariante de SPSS).

Para estudiar la relación entre variables cuantitativas, se han realizado correlaciones (Procedimiento Correlaciones bivariadas de SPSS), calculando el coeficiente de correlación de Pearson.

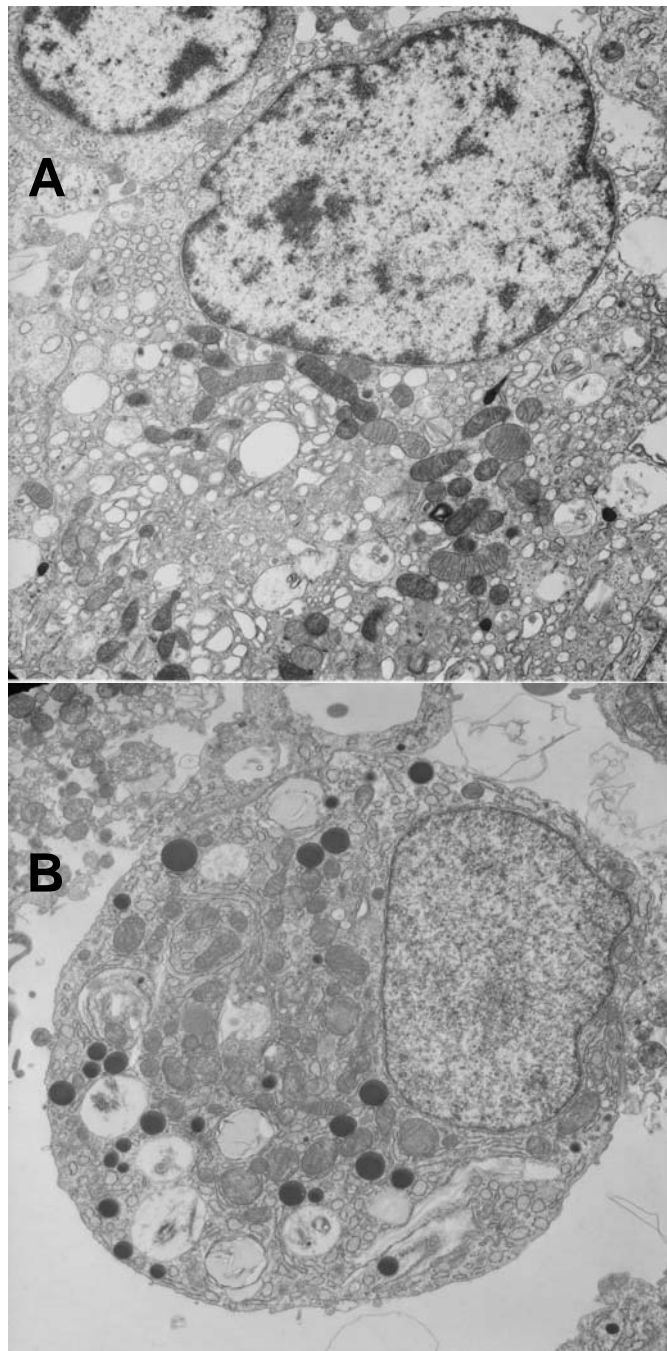
Se consideraron significativas aquellas diferencias con valores de  $p < 0.05$ .

### **3. Resultados**

#### **3.1 Microscopía Electrónica de Transmisión**

A nivel ultraestructural se comprobó la diferenciación producida por un tratamiento con 100 nM de dexametasona durante 72 h. En la figura 2 se puede observar cómo el número y el tamaño de los gránulos de zimógeno aumenta tras someter a las células AR42J a la acción de este glucocorticoide.

Figura 2. Fotografías de células AR42J típicas cultivadas durante las 72 h previas a la recogida de muestras en ausencia (A) o presencia (B) de 100 nM de dexametasona. Amplificación: x4400 para A y B.



### 3.2 Perfil de AG de las Membranas

#### 3.2.1 Efectos de la Dexametasona:

**C+DX vs. C-dx.** Los AG mayoritarios presentes en las membranas de células AR42J diferenciadas (+DX) y no diferenciadas (-dx), cultivadas en medio cuya composición en AG no se modificó (control, C) se detallan en la tabla 1.

Ácido graso	C+DX	C-dx
<b>14:0</b>	3.4 ± 0.20 *	6.4 ± 0.26
<b>16:0</b>	28.0 ± 0.21 *	35.5 ± 0.51
<b>16:1 n-7</b>	3.5 ± 0.20 *	6.5 ± 0.24
<b>18:0</b>	16.4 ± 0.26 *	13.1 ± 0.21
<b>18:1 n-9</b>	25.7 ± 0.41 *	23.6 ± 0.54
<b>18:2 n-6</b>	3.3 ± 0.12 *	1.2 ± 0.03
<b>18:3 n-3</b>	3.8 ± 0.20 *	5.7 ± 0.30
<b>20:4 n-6</b>	3.8 ± 0.11 *	1.3 ± 0.06

Tabla 1: Lista de los porcentajes de AG mayoritarios respecto al contenido total de AG presentes en las membranas de células AR42J del grupo control diferenciadas con dexametasona (+DX) o sin diferenciar (-dx). \*  $p < 0.05$  entre los dos grupos.

Los principales AG en células C+DX están descritos previamente (Audi *et al.*,2007)

Los principales AG en células C-dx en orden decreciente son: 16:0, 18:1 n-9, 18:0, 16:1 n-7, 14:0 y 18:3 n-3. El contenido de 20:0, 20:4 n-6, 18:2 n-6 and 22:0 está en valores de 1-3%.

La comparación entre C+DX y C-dx reveló diferencias significativas en los porcentajes de todos los AG ( $p < 0.05$ ).

Diferencias en AG individuales entre C+DX y C-dx reflejaron diferencias en el contenido en sumas de tipos de AG como se resume en la Figura 3A. Las células C-dx cells presentaron mayor ( $p < 0.05$ ) proporción de AG saturados (SFA), mientras que los porcentajes de UFA (*unsaturated fatty acids*), PUFA (*polyunsaturated fatty acids*) total y, concretamente, n-6 PUFA fueron mayores ( $p < 0.05$ ) en células C+DX. Los niveles de MUFA (*monounsaturated fatty acids*) y PUFA n-3 fueron similares en ambos grupos.

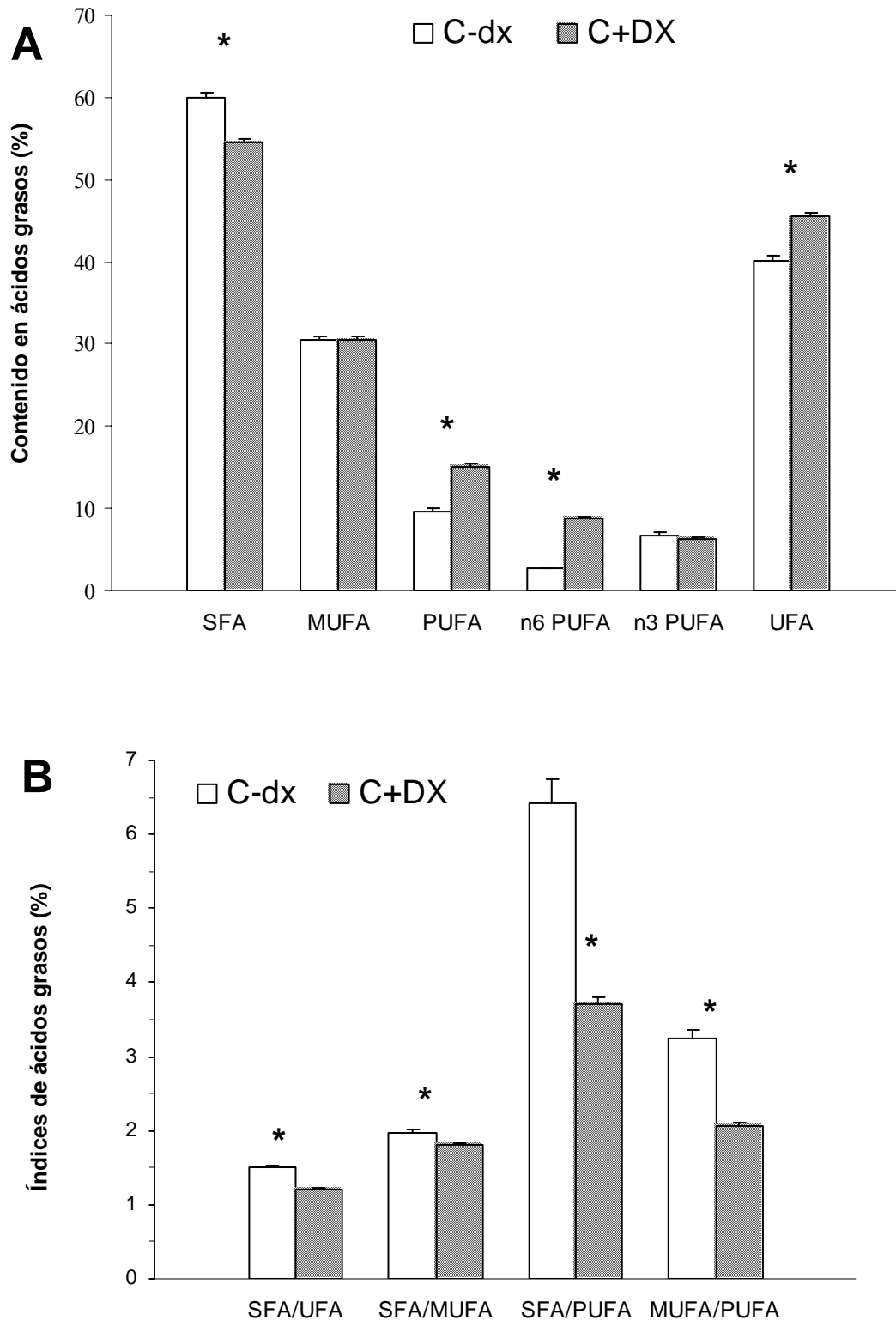


Figura 3: Perfil de AG de células AR42J cultivadas en medio con suero fetal bovino no modificado en presencia (C+DX) o ausencia (C-dx) de dexametasona durante 72 h. SFA, *saturated fatty acids*; MUFA, *monounsaturated fatty acids*; PUFA, *polyunsaturated fatty acids*; UFA, *unsaturated fatty acids*. (A) Se expresa el contenido en AG como porcentaje del contenido total. (B) Los índices de AG se expresan como ratios del porcentaje.

En células C-dx los valores de SFA/UFA, SFA/MUFA, SFA/PUFA y MUFA/PUFA fueron mayores ( $p < 0.05$ ) que en células C+DX (Figura 3B).

**3O+DX vs. 3O-dx.** El perfil de AG de membranas de AR42J tratadas con dexametasona y cultivadas durante 72 h (3 días) en medio de cultivo suplementado con 18:1 n-9 (3O+DX) se han descrito previamente (Audi *et al*, 2007).

En este trabajo hemos analizado el perfil de AG de células AR42J cultivadas durante 72 h en un medio suplementado con 18:1 n-9, pero que no contenía dexametasona (3O-dx), estas células presentaron mayores ( $p < 0.05$ ) valores de SFA, n-3 PUFA, SFA/UFA y SFA/MUFA que células del grupo 3O+DX. El nivel de UFA y MUFA/PUFA es más elevado en células diferenciadas debido a que éstas incorporaron a sus membranas más cantidad de MUFA, especialmente ácido oleico, que las células 3O-dx. Los niveles de PUFA totales y n-6 PUFA fueron similares en ambos grupos.

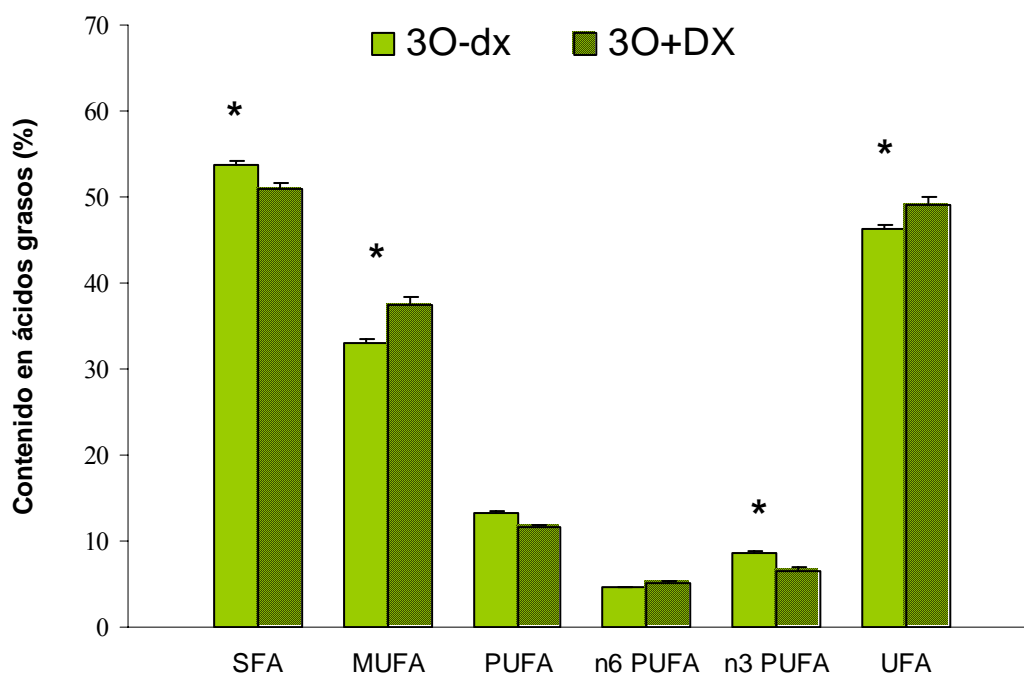


Figura 4: Contenido en AG de células AR42J cultivadas en medio enriquecido con ácido oleico durante 72 h en presencia (3O+DX) o ausencia (3O-dx) de dexametasona. SFA, *saturated fatty acids*; MUFA, *monounsaturated fatty acids*; PUFA, *polyunsaturated fatty acids*; UFA, *unsaturated fatty acids*.

**3L+DX vs. 3L-dx.** A pesar de que los valores de n-3 PUFA (debidos a los niveles de ácido linolénico) fueron mayores ( $p < 0.05$ ) en células no diferenciadas cultivadas durante 3 días con ácido linoleico (3L-dx) comparadas con células diferenciadas 3L+DX, los niveles de PUFA total y n-6 PUFA fueron similares entre

3L+DX y 3L-dx. El ratio SFA/MUFA fue menor en células 3L+DX debido a que éstas incorporan más MUFA a sus membranas que 3L-dx. Los niveles de SFA y UFA fueron similares en ambos grupos.

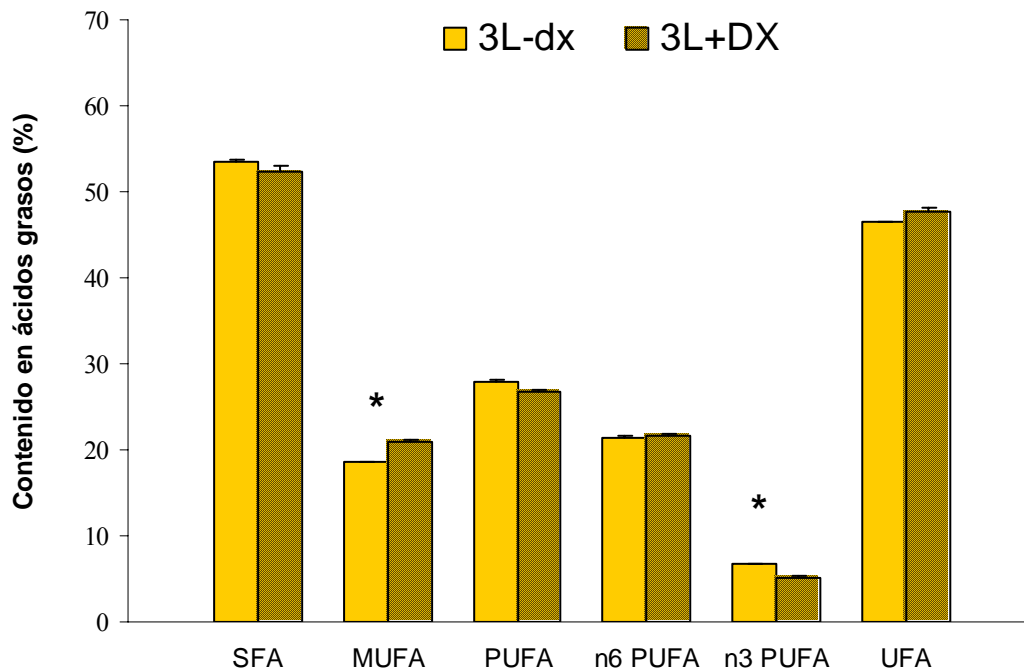


Figura 5: Contenido en AG de células AR42J cultivadas en medio enriquecido con ácido linoleico durante 72 h en presencia (3L+DX) o ausencia (3L-dx) de dexametasona. SFA, *saturated fatty acids*; MUFA, *monounsaturated fatty acids*; PUFA, *polyunsaturated fatty acids*; UFA, *unsaturated fatty acids*.

**6O+DX vs. 6O-dx.** Tras 6 días de cultivo en un medio enriquecido en ácido oleico encontramos valores de MUFA, principalmente de ácido oleico, significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) en el grupo 6O+DX que en el grupo 6O-dx. Los niveles de SFA (ácidos mirístico y palmítico), n-3 PUFA (ácido linolénico), PUFA total fueron menores en el grupo 6O+DX que en 6O-dx. El ratio SFA/UFA es mayor en 6O-dx.

**6L+DX vs. 6L-dx.** Tras 6 días de cultivo en un medio enriquecido con ácido linoleico encontramos niveles de n-6 PUFA (ácido linoleico), PUFA total y MUFA (ácido palmitoleico) significativamente mayores en 6L+DX que en 6L-dx. Las células 6L-dx presentaron niveles más elevado de SFA (ácido mirístico y palmítico) y de ratio SFA/UFA en sus membranas.

Mientras que los niveles de ácido linoleico fueron mayores en el grupo 6L+DX, los niveles de sus metabolitos, ácido c-11,14-eicosadienoico y araquidónico, son significativamente menores en 6L+DX que en 6L-dx.

**3.2.2 Efectos del Periodo de Incubación con un AG Específico:**

**3O+DX vs. 6O+DX.** Cuando las células se han tratado con dexametasona y el ácido oleico estuvo presente en el medio de cultivo durante 6 días (6O+DX) hallamos valores de SFA (16:0 y 18:0) significativamente menores que en el grupo 3O+DX. Los valores de PUFA total, UFA, MUFA (debido a una concentración incrementada de 18:1 n-9 mientras que 16:1 n-7 estaba disminuida) y n-3 PUFA (especialmente mayor cantidad de 18:3 n-3, mientras menor fue la cantidad de n-3 PUFA minoritarios tales como EPA y DHA) fueron mayores en el grupo 6O+DX que en el grupo 3O+DX.

**3O-dx vs. 6O-dx.** Cuando las células se cultivaron en ausencia de DX, los niveles de MUFA fueron similares entre los grupos 3O-dx y 6O-dx. Observamos en el grupo 6O-dx un ratio SFA/UFA menor ya que había un descenso en los ratios SFA/MUFA y SFA/PUFA. El ratio de MUFA/PUFA es menor en 6O-dx que en 3O-dx.

	3O+DX	6O+DX	3O-dx	6O-dx	
SFA	50.8 ± 0.75	44.1 ± 0.81	53.8 ± 0.49	49.3 ± 0.35	! @ a b
MUFA	37.5 ± 0.97	42.1 ± 0.62	33.0 ± 0.47	34.5 ± 0.46	! a b
PUFA	11.7 ± 0.23	13.8 ± 0.37	13.3 ± 0.17	16.3 ± 0.21	! @ b
n-6 PUFA	5.1 ± 0.13	4.5 ± 0.15	4.6 ± 0.15	4.8 ± 0.12	
n-3 PUFA	6.5 ± 0.32	9.3 ± 0.30	8.7 ± 0.16	11.4 ± 0.13	! @ a b
UFA	49.2 ± 0.75	55.9 ± 0.81	46.2 ± 0.49	50.7 ± 0.35	! @ a b
18:1 n-9	32.4 ± 1.11	39.1 ± 0.71	29.4 ± 0.59	32.1 ± 0.47	! @ a b
SFA / UFA	1.0 ± 0.03	0.8 ± 0.03	1.2 ± 0.02	1.0 ± 0.01	! @ a b
SFA / MUFA	1.4 ± 0.06	1.1 ± 0.03	1.6 ± 0.04	1.4 ± 0.03	! @ a b
SFA / PUFA	4.4 ± 0.05	3.2 ± 0.13	4.1 ± 0.07	3.0 ± 0.04	! @
MUFA / PUFA	3.2 ± 0.15	3.1 ± 0.08	2.5 ± 0.05	2.1 ± 0.05	@ a b

Tabla 2: Comparación del contenido (% del total) y de los índices de AG entre células AR42J cultivadas en presencia de ácido oleico durante 3 (3O) o 6 días (6O) en presencia (+DX) o ausencia (-dx) de dexametasona. SFA, *saturated fatty acids*; MUFA, *monounsaturated fatty acids*; PUFA, *polyunsaturated fatty acids*; UFA, *unsaturated fatty acids*. Significaciones estadísticas:

!: 3O+DX vs. 6O+DX (p < 0.05)

@: 3O-dx vs. 6O-dx (p < 0.05)

a: 3O+DX vs. 3O-dx (p < 0.05)

b: 6O+DX vs. 6O-dx (p < 0.05)



**3L+DX vs. 6L+DX.** Células cultivadas en presencia de DX y medio de cultivo enriquecido con ácido linoleico durante 6 días (6L+DX) mostraron valores significativamente ( $p < 0.05$ ) menores de SFA (especialmente 16:0 y 18:0) y MUFA (16:1 n-7 y 18:1n-9) y valores mayores de UFA y PUFA total (debido a que n-6 PUFA como 18:2, 20:2 y 20:4 fueron mayores) que en el grupo 3L+DX. En 6L-DX hubo un incremento del ratio SFA/MUFA y un descenso de SFA/PUFA y SFA/UFA. El ratio de MUFA/PUFA fue menor en 6L+DX que en 3L+DX.

**3L-dx vs. 6L-dx.** En células del grupo 6L-dx los niveles de los principales SFA (16:0), MUFA (16:1 n-7 y 18:1 n-9) y n-3 PUFA (18:3 n-3) disminuyeron en comparación con 3L-dx. Los niveles de UFA y PUFA total fueron mayores tras 6 días debido a mayores valores de 18:2 n-6, 20:2 n-6 and 20:4 n-6. Los cambios en los ratios fueron paralelos a los cambios en células diferenciadas (3L+DX vs. 6L+DX).

	3L+DX	6L+DX	3L-dx	6L-dx			
SFA	52.4 ± 0.57	42.7 ± 1.25	53.6 ± 0.17	49.1 ± 0.74	#	~	d
MUFA	20.9 ± 0.26	15.7 ± 0.66	18.5 ± 0.16	12.9 ± 0.77	#	~	c d
PUFA	26.7 ± 0.35	41.7 ± 1.88	28.0 ± 0.29	38.0 ± 1.48	#	~	d
n-6 PUFA	21.6 ± 0.28	36.5 ± 2.01	21.3 ± 0.32	32.3 ± 1.65	#	~	d
n-3 PUFA	5.0 ± 0.26	5.2 ± 0.20	6.6 ± 0.07	5.7 ± 0.20		~	c
UFA	47.6 ± 0.57	57.3 ± 1.25	46.4 ± 0.17	50.9 ± 0.74	#	~	d
18:2 n-6	17.0 ± 0.21	24.7 ± 1.78	13.2 ± 0.50	19.2 ± 1.03	#	~	c d
SFA / UFA	1.1 ± 0.03	0.7 ± 0.04	1.2 ± 0.01	1.0 ± 0.03	#	~	d
SFA / MUFA	2.5 ± 0.06	2.7 ± 0.05	2.9 ± 0.02	3.9 ± 0.13	#	~	c d
SFA / PUFA	2.0 ± 0.05	1.0 ± 0.08	1.9 ± 0.03	1.3 ± 0.09	#	~	
MUFA / PUFA	0.8 ± 0.01	0.4 ± 0.03	0.7 ± 0.01	0.4 ± 0.04	#	~	

Tabla 3: Comparación del contenido (% del total) y de los índices de AG entre células AR42J cultivadas en presencia de ácido linoleico durante 3 (3L) o 6 días (6L) en presencia (+DX) o ausencia (-dx) de dexametasona. SFA, *saturated fatty acids*; MUFA, *monounsaturated fatty acids*; PUFA, *polyunsaturated fatty acids*; UFA, *unsaturated fatty acids*. Significaciones estadísticas:

#: 3L+DX vs. 6L+DX ( $p < 0.05$ )

~: 3L-dx vs.6L-dx ( $p < 0.05$ )

c: 3L+DX vs. 3L-dx ( $p < 0.05$ )

d: 6L+DX vs. 6L-dx ( $p < 0.05$ )

### 3.3 Secreción de amilasa

#### 3.3.1 Efectos de la Dexametasona:

**C+DX vs. C-dx.** Cuando comparamos la secreción basal de amilasa en células C+DX frente a C-dx, vemos que las células C-dx tienen una actividad amilásica basal significativamente mayor. Sin embargo, cuando comparamos la secreción neta, es decir, la secreción estimulada con secretagogo respecto a la basal no observamos diferencias entre los dos grupos.

**3O+DX vs. 3O-dx.** En células AR42J cultivadas durante 3 días en presencia de un medio rico en ácido oleico diferenciadas (3O+DX) o no (3O-dx) observamos que la secreción basal es mayor en células 3O-dx respecto 3O+DX.

Cuando comparamos la secreción neta de amilasa en 3O+DX y 3O-dx observamos que a concentraciones altas de CCK-8 ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M) la secreción neta es significativamente mayor en las células 3O+DX.

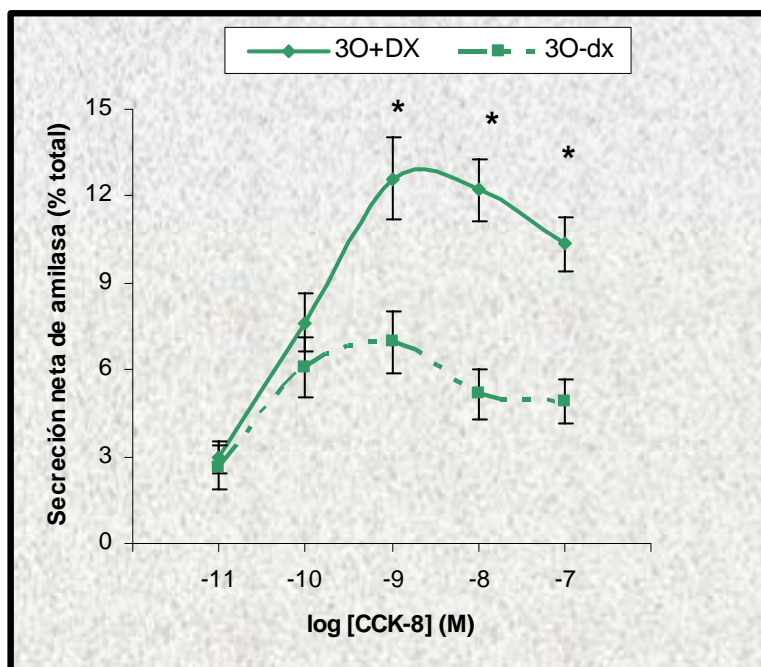


Figura 6: Secreción neta de amilasa (incremento sobre la secreción basal) estimulada por el octapéptido de colecistoquinina (CCK-8) en células AR42J cultivadas en medio enriquecido con ácido oleico durante 72 h en presencia (3O+DX) o ausencia (3O-dx) de dexametasona. La secreción de amilasa secretada durante la incubación (37 °C, 50 min) está expresada como porcentaje del contenido inicial total. Los errores estándares de la media están representados por líneas verticales. \*  $p < 0.05$  entre los grupos.

**3L+DX vs. 3L-dx.** En células 3L+DX los niveles de secreción basal de amilasa son similares en 3L+DX y 3L-dx. La secreción neta de la enzima, estimulada por altas concentraciones de CCK-8 ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M) es significativamente mayor en 3L+DX.

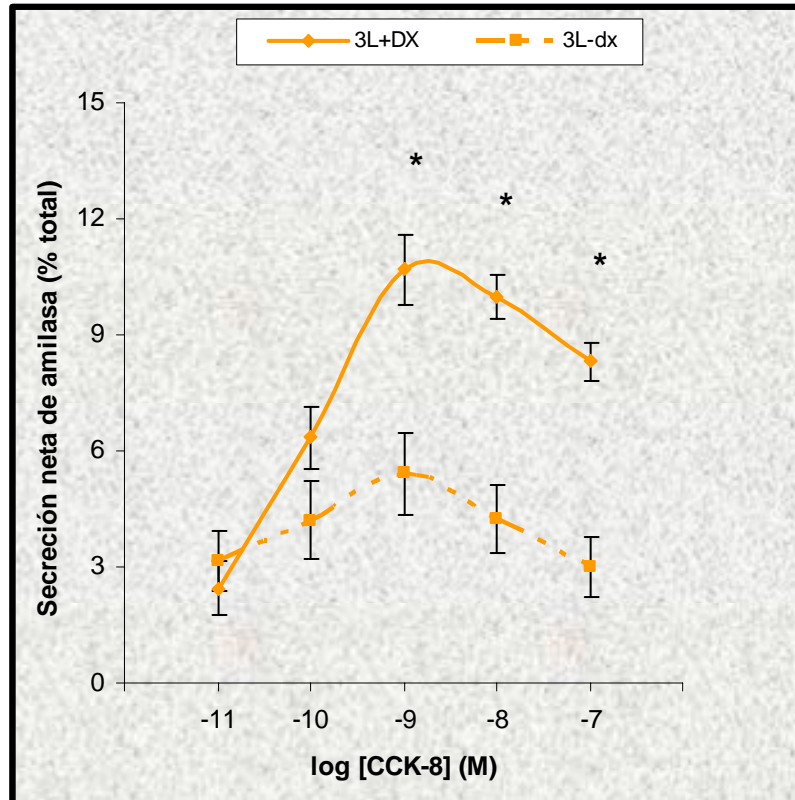


Figura 7: Secreción neta de amilasa (incremento sobre la secreción basal) estimulada por el octapéptido de colecistoquinina (CCK-8) en células AR42J cultivadas en medio enriquecido con ácido linoleico durante 72 h en presencia (3L+DX) o ausencia (3L-dx) de dexametasona. La secreción de amilasa secretada durante la incubación (37 °C, 50 min) está expresada como porcentaje del contenido inicial total. Los errores estándares de la media están representados por líneas verticales. \*  $p < 0.05$  entre los grupos.

**6O+DX vs. 6O-dx.** En células 6O+DX los niveles de secreción neta de amilasa, estimulada por altas concentraciones de CCK-8 ( $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M) son significativamente mayores que en las células no diferenciadas (6O-dx). La secreción basal de amilasa es similar en ambos grupos.

**6L+DX vs. 6L-dx.** La secreción neta de la enzima tras estimular con concentraciones altas de CCK-8 ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M) es significativamente mayor en las células 6L+DX respecto a 6L-dx. La secreción basal de amilasa es similar en ambos grupos.

### **3.3.2 Efectos del Periodo de Incubación con un AG Específico:**

**3O+DX vs. 6O+DX.** No hemos encontrado diferencias significativas entre las células diferenciadas expuestas 3 o 6 días al medio enriquecido en ácido oleico tanto en la secreción basal como en la neta, tras estimulación con CCK-8, con la excepción de la secreción neta en respuesta a CCK 1nM que fue mayor en las células 3O+DX que en las 6O+DX.

**3O-dx vs. 6O-dx.** Al comparar estos dos grupos encontramos, para la secreción basal de amilasa, valores superiores en el grupo 3O-dx. Si hablamos de secreción neta estimulada no hay diferencias significativas entre los dos grupos.

**3L+DX vs. 6L+DX.** La secreción basal de amilasa es significativamente más alta en las células diferenciadas y expuestas 3 días a un medio rico en ácido linoleico, 3L+DX que en las 6L+DX. Pero si comparamos la secreción neta estimulada, es similar en ambos grupos.

**3L-dx vs. 6L-dx.** La secreción basal de amilasa es significativamente más alta en las células no diferenciadas y expuestas durante 3 días a un medio rico en ácido linoleico, 3L-dx que en las 6L-dx. Pero si comparamos la secreción neta estimulada, es similar en ambos grupos.

### **3.3.3 Efectos de la Adición de AG**

**C+DX vs. 3O+DX vs. 3L+DX.** Cuando estudiamos el efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con diferentes AG durante tres días sobre la secreción neta de amilasa estimulada con CCK-8, observamos mayores valores en el grupo 3O+DX a cualquier dosis del secretagogo, al compararlos con el grupo C+DX. La secreción basal es similar en C+DX y 3O+DX.

En el caso de 3L+DX se observa mayor secreción neta de la enzima a concentraciones altas de CCK-8 ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M) que en las C+DX. La secreción basal es mayor en 3L+DX que en C+DX.

Al comparar 3O+DX vs. 3L+DX la secreción neta de amilasa es mayor en 3O+DX sólo para las concentraciones más altas de CCK-8 ( $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M). La secreción basal es similar en ambos grupos enriquecidos con AG.

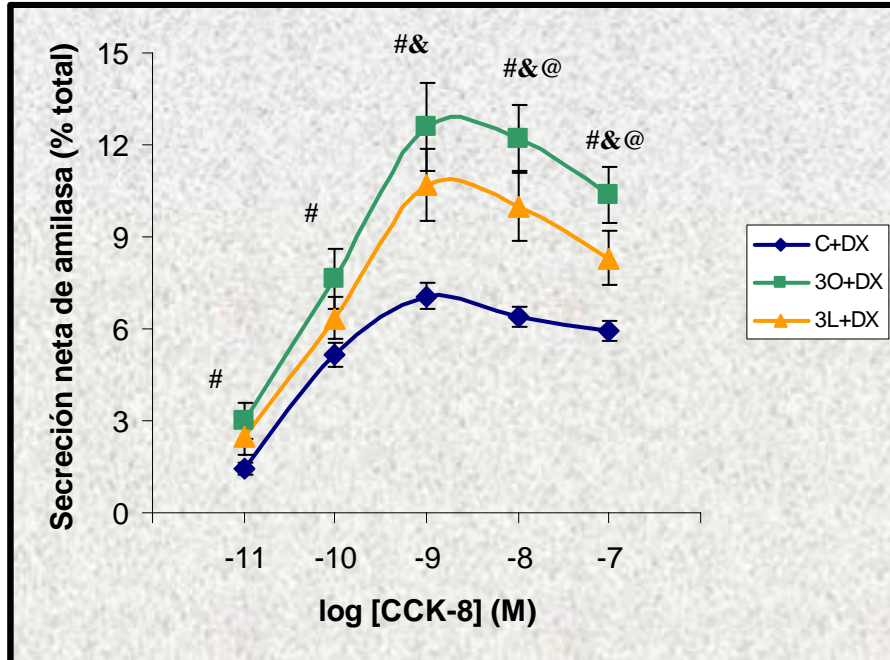


Figura 8: Secreción neta de amilasa (incremento sobre la secreción basal) estimulada por el octapéptido de colecistoquinina (CCK-8) en células AR42J cultivadas en medio con dexametasona (+DX) y enriquecido con diferentes AG (FCS no modificado: C+DX; FCS enriquecido en ácido oleico: O+DX enriquecido en ácido linoleico: L+DX) durante 72 h. La secreción de amilasa secretada durante la incubación (37 °C, 50 min) está expresada como porcentaje del contenido inicial total. Los errores estándares de la media están representados por líneas verticales. Significaciones estadísticas ( $p < 0.05$ ): #: C+DX vs. O+DX; &: C+DX vs. L+DX; @: O+DX vs. L+DX.

**C-dx vs. 3O-dx vs. 3L-dx.** En el caso de células no diferenciadas, la secreción neta de amilasa es similar en 3O-dx frente a C-dx y L-dx. Encontramos diferencias entre C-dx y 3L-dx para dosis de CCK-8 de  $10^{-9}$  M y  $10^{-7}$  M. La secreción basal de la enzima es similar en los tres grupos

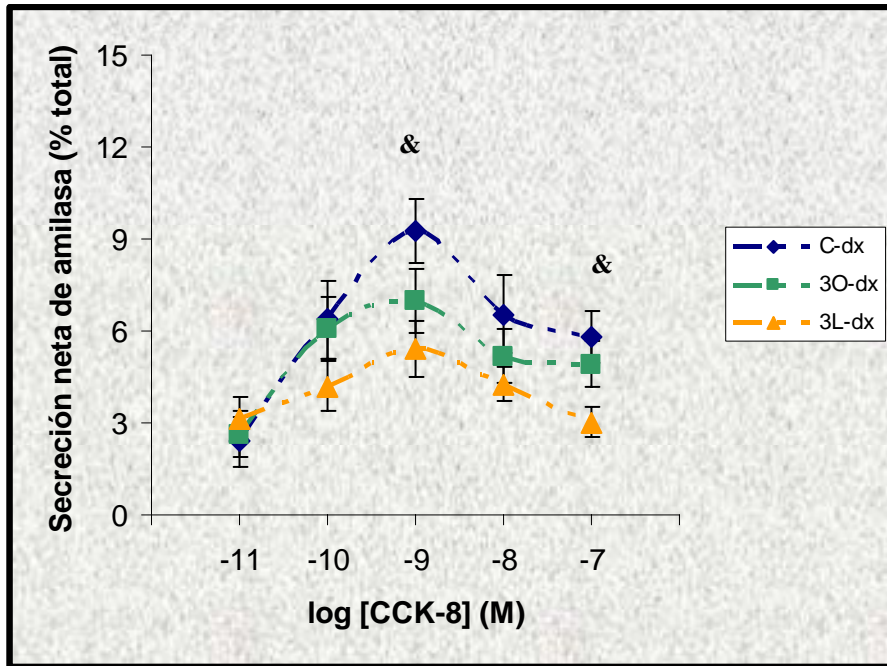


Figura 9: Secreción neta de amilasa (incremento sobre la secreción basal) estimulada por el octapéptido de colecistoquinina (CCK-8) en células AR42J cultivadas en medio sin dexametasona (-dx) enriquecido con diferentes AG (FCS no modificado: C-dx; FCS enriquecido en ácido oleico: O-dx enriquecido en ácido linoleico: L-dx) durante 72 h. La secreción de amilasa secretada durante la incubación (37 °C, 50 min) está expresada como porcentaje del contenido inicial total. Los errores estándares de la media están representados por líneas verticales. Significaciones estadísticas ( $p < 0.05$ ): &: C-dx vs. L-dx.

**C+DX vs. 6O+DX vs. 6L+DX.** Cuando estudiamos el efecto sobre la secreción de amilasa del cultivo durante 6 días en medios de cultivo con una composición diferente en AG en células diferenciadas, observamos que la secreción neta en el grupo 6O+DX es significativamente mayor para altas concentraciones de CCK-8 ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M) que en el grupo C+DX.

Cuando comparamos la secreción neta de amilasa entre C+DX y 6L+DX no encontramos diferencias significativas excepto en la secreción estimulada por  $10^{-7}$  M de CCK-8, que es mayor en 6L+DX.

Cuando comparamos secreción neta en el grupo 6O+DX con la secreción neta en el 6L+DX, sólo se aprecian diferencias significativas a dosis de  $10^{-8}$  M de CCK-8.

Las diferencias en la secreción basal las encontramos entre células 6O+DX y 6L+DX.

**C-dx vs. 6O-dx vs. 6L-dx.** Cuando estudiamos el efecto que produce el cultivo en un medio de diferente composición en AG durante seis días, en células no diferenciadas sobre la secreción neta de amilasa observamos que no hay diferencias entre C-dx y 6O-dx. En el caso de C-dx frente a 6L-dx la única diferencia que hay en la secreción neta es para dosis de 1nM de CCK-8, que es mayor en el grupo C-dx

Si comparamos 6O-dx frente a 6L-dx, la única diferencia que encontramos en la secreción neta es a  $10^{-7}$  M de CCK-8, siendo significativamente mayor en el grupo 6O-dx.

La secreción basal es mayor en C-dx frente a 6O-dx y 6L-dx.

### 3. 4 Relación entre Índice de Insaturación (UI) y Secreción Basal de Amilasa

Estudiando posibles correlaciones entre diferentes índices de la composición en AG de membrana y secreción de amilasa hemos encontrado que en células no diferenciadas con dexametasona existe una correlación lineal entre el UI y el porcentaje de secreción basal de amilasa. Esta correlación no se encuentra en células diferenciadas.

Índice de Insaturación (UI)		Secreción Basal de Amilasa	
1.0 ± 0.04	C-dx	C-dx	20.3 ± 1.22
1.4 ± 0.03	3O-dx	3O-dx	20.0 ± 1.93
1.7 ± 0.01	3L-dx	3L-dx	17.4 ± 1.78
1.7 ± 0.02	6O-dx	6O-dx	14.1 ± 1.18
2.2 ± 0.07	6L-dx	6L-dx	12.0 ± 1.02

A

Índice de Insaturación (UI)		Secreción Basal de Amilasa	
1.5 ± 0.03	3O+DX	3L+DX	17.1 ± 0.80
1.5 ± 0.03	C+DX	3O+DX	15.3 ± 0.72
1.7 ± 0.04	3L+DX	6O+DX	15.1 ± 1.52
1.9 ± 0.07	6O+DX	C+DX	13.9 ± 0.47
2.8 ± 0.14	6L+DX	6L+DX	11.4 ± 0.78

B

Tabla 4 : Valores de media±E.E.M. del índice de insaturación de las membranas celulares y secreción basal de amilasa de células AR42J cultivadas durante 3 o 6 días en medio con distintos AG en ausencia (A) o presencia (B) de dexametasona.

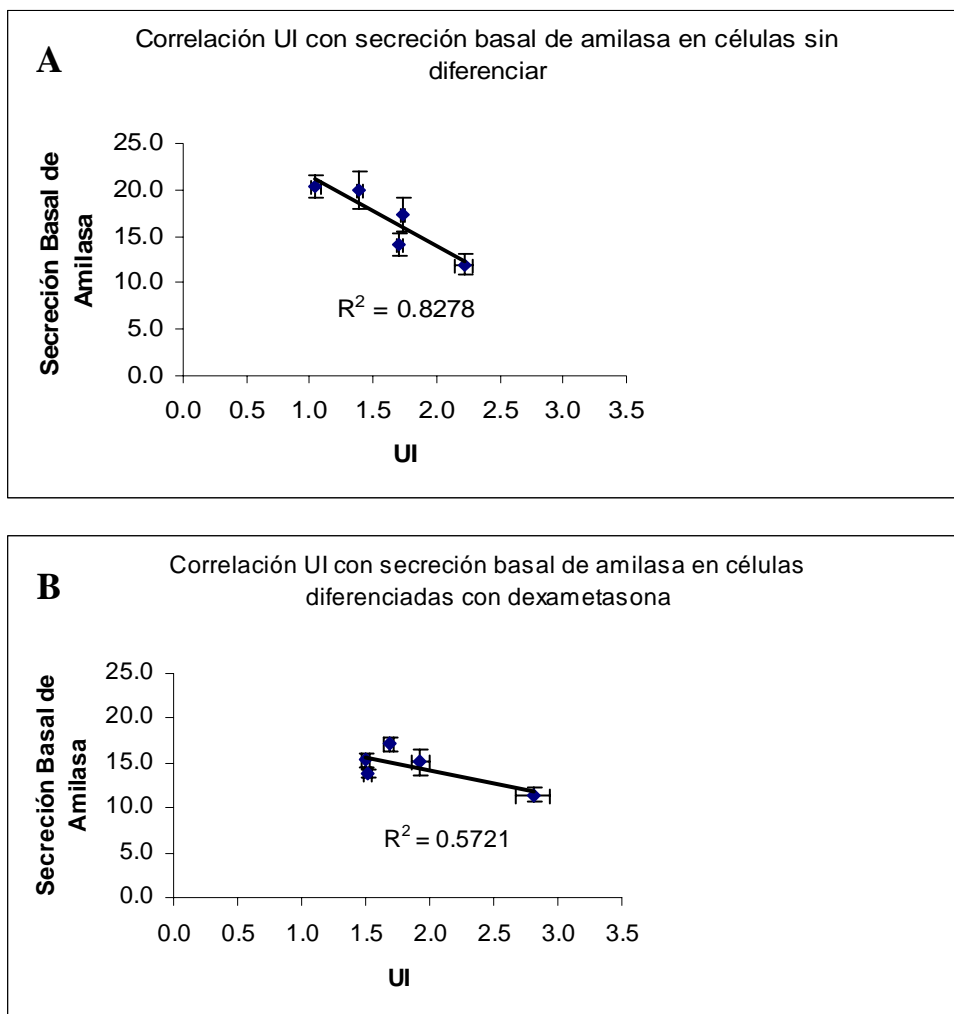


Figura 10: Correlación entre el índice de instauración (UI) de las membranas y las secreción basal de amilasa de células AR42J cultivadas durante 3 o 6 días en medio con distintos AG en ausencia (A) o presencia (B) de dexametasona.



#### **4. Discusión**

##### **4.1 Secreción basal de amilasa en células AR42J control**

En nuestras condiciones experimentales, la secreción basal de amilasa en las células AR42J control, tanto diferenciadas (C+DX) como no diferenciadas (C-dx), es superior a la que encontrábamos en células acinares pancreáticas de ratas alimentadas con un pienso estándar que eran del orden de  $5.73 \pm 0.71$  (Yago *et al.*, 2006). Por otro lado, el tratamiento de las células AR42J con dexametasona redujo la secreción basal respecto a las células sin diferenciar.

Estos resultados coinciden con los de De Lisle *et al.* (2005) que trabajando con las células AR42J tratadas con dexametasona encontraron una secreción basal de amilasa más alta que la descrita para células acinares pancreáticas de rata. Además, De Lisle *et al.* (2005) incrementaron el proceso de maduración haciendo que las células AR42J expresaran la proteína muclina que no se expresa ni en las células AR42J diferenciadas y ni en las no diferenciadas, y observaron que el descenso en los valores de secreción basal de amilasa es aún mucho mayor.

Otros autores, como Huang *et al.* (2002) también describieron valores de secreción basal de amilasa superiores a los descritos para células acinares pancreáticas de rata y describieron reducciones de la secreción basal de las células AR42J tras el tratamiento con dexametasona.

Todo ello que indica un efecto del proceso de maduración de las vías secretoras sobre la secreción basal de amilasa.

En nuestro caso, la reducción en la secreción basal, de células diferenciadas con 100 nM de dexametasona durante 72 h, es más marcada que la que encuentran estos autores. Esto puede ser debido a que, en nuestro caso, utilizamos las condiciones de dosis y tiempo que se consideran en bibliografía como óptimas para lograr un máximo grado de diferenciación de la línea celular AR42J, en las cuales, el periodo de tratamiento con dexametasona y/o la dosis empleada es mayor que la utilizadas por Huang *et al.* (2002) y De Lisle *et al.* (2005).

La dexametasona, como ya hemos indicado anteriormente, hace que las células AR42J se diferencien hacia un fenotipo exocrino (figura 2), similar al de la célula acinar pancreática. Se ha podido comprobar que este tratamiento produce un incremento en la tasa de síntesis y niveles de ARNm para diversas proteínas de secreción, incluyendo amilasa, tripsinógeno, quimiotripsinógeno, procarboxipeptidasa y lipasa, que además aparecen contenidas en gránulos de zimógeno. A nivel ultraestructural, la dexametasona conduce a un aumento en el tamaño de distintos orgánulos (figura 2). Así, el retículo endoplasmático rugoso aumenta más de 30 veces. También ocasiona la aparición de uniones *gap* intercelulares. Todo ello nos indica que la dexametasona no solamente induce síntesis de enzimas, sino también reorganización de éstas en los compartimentos celulares implicados en las vías secretoras (Logsdon *et al.*, 1985, 1987; Swarovsky *et al.*, 1988).

Por otro lado, Logsdon *et al.* (1985; 1986) han visto que los glucocorticoides inducen un incremento en el número de receptores de CCK en las células AR42J, y que este incremento potencia la sensibilidad de las células hacia este secretagogo.

Distintos trabajos (Qiu *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002) en los que se ha confirmado que la dexametasona regula al alza la expresión de varias proteínas como sintaxinas, SNAP, VAMP, rab3 y Munc18 presentes en las células acinares, junto con los estudios de Logsdon *et al.* (1985, 1986), nos indican que la línea celular AR42J proporciona un modelo *in vitro* útil para la diferenciación hacia célula acinar pancreática que incluye la mayoría, pero no todos los marcadores de diferenciación para la vía de secreción regulada (Hodel & Edwardson, 2000; Gaisano *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2004; De Lisle, 2005), como por ejemplo, encontramos una ausencia de muclina. En base a todos estos hallazgos, esta línea celular viene siendo usada ampliamente por numerosos autores como modelo de secreción pancreática.

En la célula acinar pancreática se ha descrito la existencia de cuatro vías para la secreción de proteínas: la vía constitutiva, la vía similar a la constitutiva, la vía regulada y la vía regulada minoritaria. La vía constitutiva se ha propuesto como la ruta por la cual las nuevas proteínas de membrana sintetizadas alcanzan la membrana plasmática. Actualmente se ha sugerido que las vías similar a la constitutiva y la regulada

minoritaria son responsables de la liberación de proteínas secretoras por exocitosis a tasa baja para acomodar la digestión en el duodeno entre comidas (secreción basal o de reposo). Las proteínas secretoras que entran en cualquiera de estas dos vías consisten principalmente en proteínas sintetizadas *de novo*. La vía regulada minoritaria parece mediar la liberación de proteínas secretoras directamente a la superficie de la célula acinar por exocitosis. Esta misma vía es más sensible a estimulación por secretagogos que los gránulos secretores maduros. La vía similar a la constitutiva difiere de la regulada minoritaria en que es insensible a secretagogos y sigue una ruta indirecta hacia la superficie celular que puede ser canalizada a través de compartimentos endosomales. Las secreciones similar a la constitutiva y regulada minoritaria son cuantitativamente mucho menores que la secreción regulada (Gorelick & Jamieson, 2006).

La secreción regulada se origina desde un *pool* de almacenamiento que excluye a las proteínas secretoras sintetizadas *de novo* y se forma lentamente durante la fase interdigestiva. Es capaz de secretar entre un 15% y un 30% del contenido de la glándula en proteína secretora por exocitosis regulada clásica, y es estimulada al máximo tras la ingestión de una comida, cuando la liberación de cantidades masivas de enzimas digestivos y zimógenos se requiere en mayores cantidades que aquellos que se pueden alcanzar por la síntesis de proteína *de novo*. La exocitosis de gránulos de zimógeno no parece contribuir a la secreción en reposo (Gorelick & Jamieson, 2006).

El propósito de estos diferentes mecanismos de secreción es desconocido pero, probablemente, sirven tanto para asegurar que algunos enzimas digestivos estén presentes en el intestino delgado en cualquier momento, como para suministrar una respuesta secretora proporcional a los nutrientes lumbales. La vía regulada minoritaria puede servir para incrementar la secreción de enzimas en respuesta a cantidades menores de alimento que las que se presentan tras una comida completa. Finalmente, un papel novedoso para los compartimentos constitutivo y regulado minoritario sugerido por Castle *et al.* (2002) es que podrían proporcionar las proteínas necesarias en la membrana plasmática para que se puedan fusionar los gránulos de zimógeno durante la exocitosis (Gorelick & Jamieson, 2006).

Los cambios en la secreción basal de amilasa tras tratamiento con dexametasona podrían deberse, al menos en parte, a la reorganización y a cambios en la participación relativa de estas vías en la secreción de enzimas.

En células secretoras aisladas, donde no hay presencia de secretagogo en el medio, la secreción basal de amilasa se atribuye a la vía similar a la constitutiva. Los porcentajes de secreción de amilasa de esta vía son, en células acinares aisladas, del 4-5% (Yago *et al.*, 2006) del contenido total de la enzima. En las células AR42J la secreción basal de amilasa representa hasta un 20% de la actividad amilásica total de estas células, es decir, del orden de 4-6 veces superior. La diferenciación de las células AR42J con dexametasona produce una organización similar a la de la célula acinar de rata que disminuye los niveles de secreción basal a valores por debajo del 15% del total, tendiendo a acercarse a los valores encontrados en células pancreáticas acinares aisladas de rata.

No excluimos que este efecto de la dexametasona sobre la secreción basal de amilasa que hemos comentado pueda, en parte, atribuirse también a las modificaciones en la composición de la membrana celular, en el sentido en que aumenta la insaturación y fluidez de la membrana.

En trabajos realizados *in vivo* e *in vitro* con células acinares pancreáticas hemos demostrado (Diaz *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2004; Yago *et al.*, 2004, 2006) que los cambios en el perfil lipídico de la membrana afectan a su funcionalidad y, concretamente, a la secreción de amilasa tanto en condiciones basales como en respuesta a estímulos.

El tratamiento de células AR42J control con dexametasona produjo, como ya hemos indicado, un aumento del grado de poliinsaturación, concretamente de los PUFA n-6 y una disminución de la saturación.

En estudios de adaptación realizados en ratas con dietas que sólo difieren en el grado de instauración de la fuente grasa, la membrana se adaptaba incorporando el AG mayoritario de la fuente grasa, oleico o linoleico, pero la proporción de SFA era similar en las membranas de los diferentes grupos (Yago *et al.*, 2004).

La resistencia de la fracción de SFA a las alteraciones producidas por la dieta es un hecho común en diferentes células y tejidos (Begin *et al.* 1990; Vajreswari & Narayanareddy, 1992; Suarez *et al.* 1996b; Quiles *et al.* 1999; Soriguer *et al.* 2000; Yago *et al.*, 2004), además en estos experimentos tampoco cambiaba el UI. Esto sugiere que la membrana desarrolla un alto grado de homeostasis con respecto a estos parámetros (Vajreswari & Narayanareddy, 1992), y que los cambios en la proporción de los AG más importantes están asociados a una compensación metabólica para mantener la fluidez de la membrana plasmática dentro de ciertos valores.

Parece claro que el patrón de modificación del perfil lipídico de la membrana producido por la dexametasona es diferente de lo que llamamos adaptación a la dieta, y que los cambios en la secreción basal son debidos a otras razones, puesto que en ratas adaptadas a dietas que difieren en la fuente grasa, la poliinsaturación debida a la adaptación a dieta rica en aceite de girasol dio lugar a una secreción basal aumentada y no se modificó el UI respecto a las ratas que consumieron dieta rica en aceite de oliva (Yago *et al.*, 2004); mientras que la dexametasona produce los efectos contrarios disminuyendo la secreción basal de células C+DX respecto a células sin diferenciar y modificando la instauración.

En el caso del tratamiento de las células AR42J con dexametasona observamos que el UI se modifica respecto a células no sometidas a este tratamiento, lo que nos indica un aumento en la fluidez de las membranas celulares que podría ser el causante de esta disminución de la secreción basal que observamos en las células control diferenciadas respecto a las no diferenciadas. Como ha descrito Heisler S. (1989), los cambios en la fluidez de membrana se asocian con modificaciones en la secreción de amilasa en células exocrinas de páncreas.

#### **4.2 Efecto del Tipo y Periodo de Adaptación a la Presencia en el Medio de AG de Distinto Grado de Insaturación sobre la Composición de la Membrana y la Secreción Basal de Amilasa en Células AR42J. Influencia de la Diferenciación con Dexametasona**

Cuando adaptamos las células AR42J adicionando al medio AG de distinto grado de insaturación (ácido oleico o ácido linoleico), observamos cambios en la insaturación de la membrana, siendo los más acusados los encontrados tras la adaptación a ácido linoleico durante 6 días (tabla 4).

En células AR42J no diferenciadas la secreción basal de amilasa (expresada en porcentajes del contenido total), va disminuyendo de forma paralela e inversa a los cambios en la insaturación de membrana, de hecho existe una correlación lineal ( $r = -0.91$ ) entre el UI y el porcentaje de secreción basal de amilasa, acercándose esta última a valores similares a los obtenidos en las células control diferenciadas (figura 10A).

Sin embargo, cuando las células se diferencian con dexametasona, la secreción basal de amilasa y el índice de insaturación de la membrana, tras adaptación a los AG, no tienen comportamientos opuestos, no existiendo una correlación entre ambos parámetros (figura 10B).

Estos resultados parecen indicar que en células no diferenciadas, los cambios en la fluidez de la membrana, por la modificación en el UI, tras la adaptación a la presencia de ácido oleico y linoleico en el medio, es probable que modifique la actividad de la vía similar a la constitutiva, principal implicada en la secreción enzimática en ausencia de secretagogos (basal o de reposo), disminuyéndola en las células con las membranas más insaturadas.

Por el contrario, la diferenciación con dexametasona parece que modifica este comportamiento secretor, en el sentido de poner en marcha mecanismos homeostáticos que tamponan los cambios en la fluidez de la membrana por insaturación y su influencia sobre la secreción enzimática observada en células no diferenciadas. Por otro lado, la diferenciación, parece afectar a la contribución cuantitativa relativa de la secreción basal de amilasa de las vías secretoras implicadas en ella.

Debemos destacar que en células diferenciadas, la secreción basal de amilasa en las células 3L+DX es significativamente mayor que en las células C+DX. Este comportamiento es similar al observado por nosotros (Díaz, 2003) en acinos aislados de

ratas adaptadas a dietas ricas en aceite de girasol, cuyas membranas se enriquecían en su AG mayoritario, linoleico.

Por el contrario, el comportamiento de la secreción basal de amilasa en células C+DX respecto a las diferenciadas, adaptadas durante 6 días a ácido linoleico (6L+DX), es opuesto al observado en células acinares, disminuyendo de forma significativa en las adaptadas un tiempo más prolongado, respecto a los valores obtenidos en células control.

Los elevados índices de instauración de la membrana (superiores a 2) que se observan en células adaptadas durante 6 días a ácido linoleico, dan lugar a una disminución muy marcada de la secreción basal, independientemente de que estas estén o no diferenciadas.

En conjunto, nuestros resultados nos muestran que la composición de las membranas y las características secretoras de enzimas en situación basal, de las células diferenciadas con dexametasona y adaptadas durante tres días a la presencia en el medio de ácidos oleico y linoleico, son semejantes a las descritas por nosotros en acinos aislados de ratas (Yago *et al.*, 2004, 2006) alimentadas con pienso estándar y adaptadas a dietas ricas en aceite de oliva y de girasol. Estos resultados nos llevan a elegir estas condiciones de diferenciación y adaptación para el uso de modelos celulares en los estudios de fisiología y fisiopatología celular del páncreas exocrino.

### **4.3 Secreción estimulada con CCK**

La CCK-8 es un agonista fisiológico que activa varias funciones celulares incluyendo la síntesis de enzimas digestivas y su secreción. Es bien sabido que la estimulación de células acinares pancreáticas con CCK-8 induce un incremento bifásico en la liberación de amilasa. Mientras que se incrementa la dosis de CCK-8, la secreción de enzimas de células acinares pancreáticas aumenta, se vuelve máxima, y entonces disminuye hasta una meseta. La ocupación de receptores de CCK de alta afinidad por CCK-8 parece que se correlaciona con una subida de la curva dosis-respuesta para la secreción estimulada de enzima, mientras que la ocupación de receptores de baja

afinidad por CCK-8 parece correlacionarse con el descenso de la curva dosis-respuesta para la secreción estimulada de enzima (Jensen *et al.*, 1980).

Estudios de cinética de unión de [<sup>125</sup>I]CCK-8 a células acinares pancreáticas indican que el péptido marcado se une en uno de dos estados cinéticos distintos. Uno es un estado rápidamente disociado que no depende de la temperatura de incubación o del metabolismo energético celular, no parece ser internalizado y se correlaciona con la ocupación de receptores de CCK de baja afinidad para CCK-8. El otro es un estado de disociación lenta que depende de la temperatura de incubación y el metabolismo energético celular, parece ser internalizado, y se correlaciona con la ocupación de receptores de alta afinidad para la CCK-8 (Wank *et al.*, 1988).

En las células AR42J control diferenciadas y no diferenciadas encontramos, frente al tratamiento con CCK-8 a dosis que van de 10<sup>-11</sup>-10<sup>-7</sup> M, una curva dosis-respuesta típica. Esta curva dosis-respuesta es similar a la obtenida por otros autores (Mikkat *et al.*, 2001) en células AR42J diferenciadas con dexametasona.

En todos los casos, al ir aumentando la dosis de CCK-8 aumenta la secreción neta de amilasa hasta alcanzar una dosis a la cual la secreción es máxima. A partir de este punto, las dosis mayores producen una meseta o incluso un descenso en la secreción.

La dosis de CCK-8 a la que se obtiene la respuesta máxima varía de unos autores a otros posiblemente debido a diversos factores como son: el tiempo de incubación con CCK-8, la dosis de DX empleada y el tiempo de aplicación de ésta.

Este comportamiento es similar al encontrado por nosotros (Martínez *et al.*, 2004) y otros autores en suspensiones de acinos o lóbulos pancreáticos viables de rata (Han *et al.*, 2000; Rosado *et al.*, 2002; Louie, 1994; Fink *et al.*, 1997; Linari *et al.*, 2002). En estas células la CCK-8, a distintas dosis, induce una curva bifásica en la secreción de amilasa. Se produce una liberación de amilasa dosis-dependiente que alcanza el máximo a dosis de 10<sup>-10</sup>-10<sup>-9</sup> M y se produce una disminución de la secreción a dosis mayores.



Por tanto, desde este punto de vista, el comportamiento de las células AR42J es similar al descrito por distintos autores para células acinares de rata, ya que reproducen una curva dosis-respuesta típica en respuesta a dosis crecientes de CCK-8.

Al comparar, la respuesta de las células C+DX con las células C-dx, observamos una secreción neta similar de amilasa, cuando ésta se expresa como porcentaje del contenido total.

En células acinares pancreáticas hemos podido comprobar que el contenido total de amilasa de las células acinares depende de la riqueza de carbohidratos en la dieta (Díaz, 2003), y que cuando las dietas tenían la misma composición cuantitativa en carbohidratos el contenido en amilasa era similar, aunque la fuente grasa utilizada para confeccionar la dieta fuera diferente (oliva y girasol).

Pero esto no ocurre en nuestras condiciones experimentales porque como hemos visto la DX aumenta el contenido en gránulos de zimógeno, es decir, el contenido total de enzimas es mucho mayor en las células tratadas con DX que en las no tratadas. Por tanto, podemos deducir que la secreción absoluta de amilasa es significativamente superior en células AR42J control tratadas con DX frente a una misma dosis de CCK-8.

Estos resultados coinciden con los trabajos de Huang *et al.* (2002) que observa un porcentaje de secreción de amilasa respecto al contenido total, similar para células tratadas y no tratadas con DX, aunque en células tratadas la secreción absoluta de amilasa fuera significativamente mayor por estar incrementado el contenido de esta enzima 5 veces.

Esta mayor secreción absoluta de amilasa la atribuiríamos no solo al mayor contenido, sino también, a la expresión de receptores de CCK y puesta en marcha de la vía regulada en estas células (como ya discutimos anteriormente).

Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Logsdon *et al.* (1985, 1986, 1987), que observaron un aumento en la secreción de amilasa inducido por CCK-8 en células AR42J pretratadas con DX frente a las no tratadas. Atribuyen este hecho al aumento que produce la DX en la síntesis y contenido de amilasa y al aumento del

número de receptores para CCK-8, lo que según estos autores potenciaría la sensibilidad a la CCK-8.

De acuerdo con estos resultados, la respuesta a las distintas dosis de CCK-8 en AR42J tratadas y no tratadas es similar a todas las dosis empleadas. Sin embargo, parece que en las células AR42J tratadas con DX la curva empieza a aplanarse o quedarse en meseta a la dosis de  $10^{-9}$  M de CCK-8, mientras que en el grupo no tratado esto ocurre a una dosis superior. Este distinto comportamiento estaría de acuerdo con la teoría de Logsdon *et al.* (1986) de que el tratamiento con DX potencia la sensibilidad de esta línea celular a la CCK-8.

Frente a CCK-8, las células adaptadas a distintos AG adicionados al medio de cultivo tienen comportamiento diferente a las células control. Tanto en las adaptadas a ácido oleico como a ácido linoleico aumenta la secreción neta de amilasa tras el tratamiento con DX.

Si tenemos en cuenta que en células control el tratamiento con DX apenas modifica la secreción neta de amilasas, las diferencias encontradas entre los grupos O+DX vs. O-dx y L+DX vs. L-dx hay que atribuir las al cambio en la funcionalidad producido por la modificación del perfil lipídico de la membrana potenciada por la DX. Si las diferencias entre las células control y adaptadas a distintos AG (oleico y linoleico) se debieran sólo a la dexametasona, la secreción de amilasa en células control y adaptadas sería la misma y, sin embargo, difiere marcadamente entre ellas y con las control. Si el único efecto fuera el del tipo de AG presente en el medio, la secreción neta de amilasa sería igual en las células adaptadas a oleico diferenciadas y no diferenciadas y en las adaptadas a linoleico diferenciadas o no. En las células no tratadas con dexametasona, las diferencias que se observan son mucho menores, incluso no existen entre las células adaptadas a oleico y linoleico. Esto parece indicar que la dexametasona potencia el efecto que sobre la secreción de amilasa tiene la adaptación a los dos AG.

Existe una relación entre el tratamiento con DX y la incorporación a la membrana de los AG presentes en el medio. Las células AR42J diferenciadas incorporan mayores cantidades del AG predominante en el medio (oleico o linoleico, en cada caso) frente a las células no diferenciadas. Esto podría estar relacionado con los

niveles de proliferación de las células no diferenciadas, mayores que en células AR42J diferenciadas (Nicolet *et al.*, 1991; Zenilman *et al.*, 1997). Esto puede contribuir al diferente comportamiento de la secreción de amilasa en células diferenciadas o no, que explicaría el efecto potenciador antes comentado.

Tanto en células C+DX como en células C-dx, no se observan diferencias importantes en la secreción neta de amilasa en respuesta a CCK-8, presentando patrones de respuesta similares aunque, ligeramente más aplanados en las C+DX, para dosis altas de la hormona, y descensos más marcados, a estas mismas dosis, en las C-dx.

Cuando adaptamos las células a los dos AG, oleico y linoleico, las respuestas a la CCK-8 de la secreción de amilasa son muy diferentes dependiendo de si las células han sido o no tratadas con dexametasona.

En las células tratadas, la adaptación a la presencia de AG de distinto grado de insaturación (oleico y linoleico) produce una respuesta neta de amilasa superior, sobre todo a dosis altas de CCK-8, a la obtenida en células control, siendo en las adaptadas a ácido oleico mayor esta respuesta frente a las adaptadas a ácido linoleico, y frente a las controles, incluso para concentraciones bajas de CCK-8. En contraste, las células adaptadas, no diferenciadas, presentan respuestas menores a las observadas en células controles, especialmente en respuesta a la presencia en el medio de ácido linoleico y para dosis altas de CCK-8. Este patrón opuesto de la secreción neta de amilasa en células tratadas y no tratadas con dexametasona, parece indicar que el efecto de la adaptación en células diferenciadas es diferente al que se observa en células no diferenciadas.

Si nos fijamos en los índices de insaturación de las membranas de las células en los distintos grupos experimentales, observamos varios hechos:

- Las células C+DX tienen un índice de insaturación mayor que las C-dx (1,5 vs. 1) y la secreción neta de amilasa en respuesta a distintas dosis de CCK-8 es similar en ambas.

- Cuando adaptamos las células diferenciadas a los dos AG, oleico y linoleico, el índice de insaturación de la membrana no se modifica con el primero y es mayor con el segundo, a pesar de ello, las respuestas en secreción de amilasa son muy superiores con oleico y superiores también, aunque algo menos, con linoléico.
- Cuando la adaptación a los dos AG la realizamos en células no diferenciadas los índices de insaturación en las células adaptadas están en un rango superior, tanto con oleico (1,4 vs. 1) como con linoleico (1,7 vs. 1), frente a las células control con membranas menos insaturadas. Sin embargo, la secreción neta de amilasa es menor en las adaptadas, especialmente en las del ácido linoleico.
- Los índices de insaturación de las células adaptadas, diferenciadas o no, son del mismo orden (1,5 vs. 1,4 en oleico y 1,7 vs. 1,7 en linoleico) y las respuestas netas en amilasa muy superiores en las diferenciadas respecto a las no diferenciadas (control y adaptadas) y a las control diferenciadas (tabla 4).

Este comportamiento nos hace pensar que la diferenciación de las células parece dar lugar a cambios funcionales importantes en los mecanismos globales de secreción. Estos cambios producidos por la adaptación parecen ser dependientes del tipo de AG incorporado a la membrana, y en el caso del linoleico de su efecto sobre la insaturación de membrana. Estos cambios funcionales podrían estar relacionados con:

a) modificaciones en la afinidad, capacidad, u otras propiedades de los receptores de CCK y proteínas acopladas por el ambiente lipídico en el que los rodea: Rinken *et al.* (1998) demostraron la influencia esencial de la fluidez de membrana en la regulación de la interacción entre proteínas G y receptores de CCK en membranas corticales de rata.

b) activación de mediadores lipídicos de membrana que afecten a la funcionalidad de las proteínas situadas en ellas o a la formación de moléculas de señalización celular. Los AG de los fosfolípidos de membrana pueden modular la actividad de proteínas de membrana a través de cambios en la fluidez o permeabilidad de membranas, o por unión específica e interacciones superficiales proteína-lípido. Por este mecanismo podrían verse modulados receptores, canales y enzimas. Se ha demostrado que la ingesta de grasas con distinto grado de insaturación modifica la unión de la insulina a sus

receptores en adipocitos de rata (Clandinin *et al.* 1991) y la actividad de enzimas de membrana en hígado (Neelands & Clandinin, 1983), corazón (Vajreswari & Narayanareddy, 1992) y glándula submandibular (Alam *et al.* 1993).

c) cambios en las cascadas de señalización celular ( $\text{Ca}^{2+}$ , protein kinasas, etc.): hemos comprobado en las células AR42J (datos no publicados) que los cambios en la composición lipídica de membrana conducen a diferentes concentraciones intracelulares de calcio tras estimular con CCK-8, al igual que ocurre en acinos pancreáticos de rata (Martínez *et al.*, 2004; Yago *et al.* 2004). También podría haber cambios en la funcionalidad de fosfolipasas o enzimas como las protein kinasas que interaccionan con la membrana durante su activación (Cho & Ziboh, 1994; Ikeda & Fukuoka, 2003).

d) Modificaciones estructurales o funcionales de la maquinaria secretora de la célula, incluyendo los mecanismos de exocitosis. Está demostrado (Davletov *et al.*, 2007) que la función de las proteínas de fusión de membranas SNARE está regulada, en parte, por los AG que componen la membrana en la que están insertas. Nagao *et al.* (1995) sugirieron que el cambio conformacional en los fosfolípidos de membrana inducido por fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) y la presencia de ácido araquidónico o ácido linoleico producidos por PLA<sub>2</sub> son importantes en el proceso de fusión de gránulos secretores con la membrana plasmática de células acinares de parótida de rata. Se ha descrito en células epiteliales de pulmón que determinados AG modulan la actividad fisiogénica del cuerpo lamelar y la membrana plasmática para la exocitosis (Chattopodhyay *et al.*, 2003). Ong *et al.* (2006) observaron efectos diferentes de PUFA sobre la exocitosis en células neuroendocrinas (células feocromocitoma-12).

Por el contrario, las células no diferenciadas tienen un comportamiento menos dependiente del tipo de AG y más del efecto de la adaptación sobre la insaturación de la membrana, que provoca una disminución de la respuesta neta de amilasa a la CCK-8, al contrario de lo que ocurre en las diferenciadas. Este comportamiento nos muestra que los mecanismos globales de secreción en estas células son diferentes y menos específicos, que en las diferenciadas.

Un hecho importante es que, cuando observamos la respuesta neta de secreción de amilasa a la CCK-8, en células acinares aisladas de rata (Martínez *et al.*, 2004; Yago *et al.*, 2004, Díaz, 2003), el comportamiento nos recuerda al observado en células AR42J diferenciadas. Esta semejanza es mayor en el caso de las células acinares de ratas adaptadas, durante ocho semanas a dietas ricas en aceite de oliva de alto contenido en ácido oleico, y las células AR42J tratadas con dexametasona y adicionadas durante tres días con ácido oleico en el medio de cultivo.

Además, estas semejanzas son aplicables a los índices de insaturación de las membranas de células acinares y AR42J. Todo ello, nos lleva a reafirmarnos en nuestra idea de que esta línea celular de un pancreatoma de rata, diferenciada con dexametasona y adaptadas sus membranas durante 3 días, en su perfil lipídico, a distintos AG presentes, de forma mayoritaria, en aceites de consumo humano (oleico, en aceite de oliva y linoleico, en aceite de girasol), es un buen modelo para el estudio de los cambios en la membrana y sus efectos sobre la funcionalidad celular, tanto frente a estímulos fisiológicos y como fisiopatológicos.

## **5. Bibliografía**

Abedin L, Lien EL, Vingrys AJ, Sinclair AJ. The effects of dietary alpha-linolenic acid compared with docosahexaenoic acid on brain, retina, liver, and heart in the guinea pig. *Lipids* 34:475-482, 1999.

Alam SQ, Mannino SJ, Alam BS. Reversal of diet induced changes in adenylate cyclase activity and fatty acid composition of rat submandibular salivary gland lipids. *Arch Oral Biol* 38:387-391, 1993.

Archer E, Maigret B, Escrieut C, Pradayrol L, Fourmy D. Rhodopsin crystal: New template yielding realistic models of G-protein-coupled receptors?. *Trends Pharmacol Sci* 24:36-40, 2003.

Audi N, Mesa MD, Martínez MA, Martínez-Victoria E, Mañas M, Yago MD. Membrane Lipid Composition of Pancreatic AR42J Cells: Modification by Exposure to Different Fatty Acids. *Exp Biol Med* 232:532-541, 2007.

Begin ME, Ells G, St-Jean P, Vachereau A, Beaudoin AR. Fatty acid and enzymatic compositional changes in the pancreas of rats fed dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Int J Pancreatol* 6:151-160, 1990.

Berlin E, Bhathena SJ, McClure D, Peters RC. Dietary menhaden and corn oils and the red blood cell membrane lipid composition and fluidity in hyper- and normocholesterolemic miniature swine. *J Nutr* 128:1421-1428, 1998.

Bertrand V, Bastié MJ, Bigaud C, Pyronnet S, Vaysse N, Pradayrol L. Pharmacological study of gastrin-mediated amylase release in pancreatic acinar cells (AR4-2J). *Regul Pept* 54:513-525, 1994.

Bose C, Zhang H, Udupa KB, Chowdhury P. Activation of p-ERK1/2 by nicotine in pancreatic tumor cell line AR42J: Effects on proliferation and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G926-G934, 2005.

Bozem M, Kuhlmann S, Blum R, Feick P, Schulz I. Hormone-stimulated calcium release is inhibited by cytoskeleton-disrupting toxins in AR4-2J cells. *Cell Calcium* 28:73-82, 2000.

Castle AM, Huang AY, Castle JD. The minor regulated pathway, a rapid component of salivary secretion, may provide docking/fusion sites for granule exocytosis at the apical surface of acinar cells. *J Cell Sci* 115:2963-2973, 2002.

Chattopadhyay S, Sun P, Wang P, Abonyo B, Cross NL, Liu L. Fusion of lamellar body with plasma membrane is driven by the dual action of annexin II tetramer and arachidonic acid. *J Biol Chem* 278:39675-39683, 2003.

Cho Y, Ziboh VA. Expression of protein kinase C isozymes in guinea pig epidermis: Selective inhibition of PKC-beta activity by 13-hydroxyoctadecadienoic acid-containing diacylglycerol. *J Lipid Res* 35:913-921, 1994.

Chow SC, Sisfontes L, Jondal M, Bjorkhem I. Modification of membrane phospholipid fatty acyl composition in a leukemic T cell line: effects on receptor mediated intracellular  $Ca^{2+}$  increase. *Biochim Biophys Acta* 1092:358-366, 1991.

Christophe J. Pancreatic tumoral cell line AR42J: An amphicrine model. *Am J Physiol* 266:G963-G971, 1994.

Clandinin MT, Cheema S, Field CJ, Garg ML, Venkatraman J, Clandinin TR. Dietary fat: Exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J* 5:2761-2769, 1991.

Crawley JN, Corwin RL. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 15:731-755, 1994.

Damm I, Mikkat U, Kirchhoff F, Bockmann S, Jonas L. Inhibitory effect of the lectin wheat germ agglutinin on the binding of 125I-CCK-8s to the CCK-A and -B receptors of AR42J cells. *Pancreas* 28:31-37, 2004.

Davletov B, Connell E, Darios F. Regulation of SNARE fusion machinery by fatty acids. *Cell Mol Life Sci* 64:1597-1608, 2007.

De Lisle RC, Norkina O, Roach E, Ziemer D. Expression of pro-Muclin in pancreatic AR42J cells induces functional regulated secretory granules. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C1169-C1178, 2005.

Deschenes RJ, Lorenz LJ, Haun RS, Roos BA, Collier KJ, Dixon JE. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. *Proc Natl Acad Sci* 81:726-730, 1984.

Díaz RJ. Influencia de la grasa de la dieta sobre el perfil lipídico de membranas y la función del páncreas exocrino. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2003.

Díaz RJ, Yago MD, Martinez-Victoria E, Naranjo JA, Martinez MA, Mañas M. Comparison of the effects of dietary sunflower oil and virgin olive oil on rat exocrine pancreatic secretion in vivo. *Lipids* 38:1119-1126, 2003.

Elinson N, Amichay D, Birk RZ. Leptin directly regulates exocrine pancreas lipase and two related proteins in the rat. *Br J Nutr* 96:691-696, 2006.

Engelman RM, Prasad MR, Rousou JA, Breyer RH, Bagchi M, Das DK. Steroid-induced myocardial preservation is associated with decreased cell membrane microviscosity. *Circulation* 80:III36-III43, 1989.

Field CJ, Toyomizu M, Clandinin MT. Relationship between dietary fat, adipocyte membrane composition and insulin binding in the rat. *J Nutr* 119:1483-1489, 1989.

Fink G, Yang J, Carter G, Norman J. Acute pancreatitis-induced enzyme release and necrosis are attenuated by IL-1 antagonism through an indirect mechanism. *J Surg Res* 67:94-97, 1997.



Gaisano HY, Huang X, Sheu L, Ghai M, Newgard CB, Trinh KY, Trimble WS. Snare protein expression and adenoviral transfection of amphotericin B AR42J. *Biochem Biophys Res Commun* 260:781-784, 1999.

Gaiser S, Ahler A, Gundling F, Kruse ML, Savkovic V, Selig L, Teich N, Tomasini R, Dagorn JC, Mossner J, Keim V, Bodeker H. Expression of mutated cationic trypsinogen reduces cellular viability in AR4-2J cells. *Biochem Biophys Res Commun* 334:721-728, 2005.

Gebhardt A, Ackermann W, Unver N, Elsasser HP. Expression of galectin-3 in the rat pancreas during regeneration following hormone-induced pancreatitis. *Cell Tissue Res* 315:321-329, 2004.

Giron MD, Lara A, Suarez MD. Short-term effects of dietary fats on the lipid composition and desaturase activities of rat liver microsomes. *Biochem Mol Biol Int* 40: 843-851, 1996.

Gorelick FS, Jamieson JD. Structure-function relations in the pancreatic acinar cell. In: Johnson LR, *Physiology of the gastrointestinal tract*. Burlington, MA: Academic Press, Vol II 1313-1335, 2006.

Han B, Klonowski-Stumpe H, Lüthen R, Schreiber R, Häussinger D, Niederau C. Menadione-induced oxidative stress inhibits cholecystokinin-stimulated secretion of pancreatic acini by cell dehydration. *Pancreas* 21:191-202, 2000.

Heisler S. Phospholipase A2 activation by melittin causes amylase release from exocrine pancreas. *Can J Physiol Pharmacol* 67:411-416, 1989.

Hodel A, Edwardson JM. Targeting of the zymogen-granule protein syncollin in AR42J and AtT-20 cells. *Biochem J* 350:637-643, 2000.

Hsu S, Schmid A, Sternfeld L, Anderie I, Solis G, Hofer HW, Schulz I. Tyrosine phosphatase PTP1B modulates store-operated calcium influx. *Cell Signal* 15:1149-1156, 2003.

Huang X, Sheu L, Kang Y, Eto Y, Coima I, Gaisano HY. Effects of selective endocrine or exocrine induction of AR42J on SNARE and Munc18 protein expression. *Pancreas* 25:e56-e63, 2002.

Ikeda Y, Fukuoka S. Phosphatidic acid production, required for cholecystokinin octapeptide-stimulated amylase secretion from pancreatic acinar AR42J cells, is regulated by a wortmannin-sensitive process. *Biochem Biophys Res Commun* 306:943-947, 2003.

Innis SM, Clandinin MT. Dynamic modulation of mitochondrial inner-membrane lipids in rat heart by dietary fat. *Biochem J* 193:155-167, 1981.

Iordache C, Drozdowski LA, Clandinin MT, Wild G, Todd Z, Thomson AB. Lipid malabsorption persists after weaning in rats whose dams were given GLP-2 and dexamethasone. *Lipids* 40:1141-1148, 2005.

Jensen RT, Lemp GF, Gardner JD. Interaction of cholecystokinin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:2079-83, 1980.

Jiang PH, Motoo Y, Iovanna JL, Pebusque MJ, Xie MJ, Okada G, Sawabu N. Tumor protein p53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat: Drug effects on its expression in the pancreas. *JOP* 5:205-216, 2004.

Jindrichova S, Novakova O, Bryndova J, Tvrzicka E, Lisa V, Novak F, Pacha J. Corticosteroid effect on Caco-2 cell lipids depends on cell differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 87:157-165, 2003.

Lai JK, Cheng CH, Ko WH, Leung PS. Ghrelin system in pancreatic AR42J cells: Its ligand stimulation evokes calcium signalling through ghrelin receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 37:887-900, 2005.

Landau Z, Forti E, Alcala M, Birk RZ. Palmitate induced lipoapoptosis of exocrine pancreas AR42J cells. *Apoptosis* 11:717-724, 2006.

Letteron P, Brahim-Bourouina N, Robin MA, Moreau A, Feldmann G, Pessayre D. Glucocorticoids inhibit mitochondrial matrix acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid beta-oxidation. *Am J Physiol* 272:G1141-G1150, 1997.

Linari G, Broccardo M, Nucerito V, Improta G. Selective tachykinin NK3-receptor agonists stimulate in vitro exocrine pancreatic secretion in the guinea pig. *Peptides* 23:947-953, 2002.

Logsdon CD, Moessner J, Williams JA, Goldfine ID. Glucocorticoids increase amylase mRNA levels, secretory organelles, and secretion in pancreatic acinar AR42J cells. *J Cell Biol* 100:1200-1208, 1985.

Logsdon CD, Perot KJ, McDonald AR. Mechanism of glucocorticoid-induced increase in pancreatic amylase gene transcription. *J Biol Chem* 262:15765-15769, 1987.

Logsdon CD. Glucocorticoids increase cholecystokinin receptors and amylase secretion in pancreatic acinar AR42J cells. *J Biol Chem* 261:2096-2101, 1986.

Louie DS. Cholecystokinin-stimulated intracellular signal transduction pathways. *J Nutr* 124:1315S-1320S, 1994.

Manjari V, Das UN. Effect of polyunsaturated fatty acids on dexamethasone-induced gastric mucosal damage. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 62:85-96, 2000.

Martínez MA, Lajas AI, Yago MD, Redondo PC, Granados MP, González A, Rosado JA, Martínez-Victoria E, Mañas M, Pariente JA. Dietary virgin olive oil enhances secretagogue-evoked calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Nutrition* 20:536-541, 2004.

Medow MS, Intrieri L, Moatter T, Gerritsen ME. Dexamethasone effects on microvascular endothelial cell lipid composition. *Am J Physiol* 257:C512-C519, 1989.

Mikkat U, Damm I, Kirchhoff F, Albrecht E, Nebe B, Jonas L. Effects of lectins on CCK-8-stimulated enzyme secretion and differentiation of the rat pancreatic cell line AR42J. *Pancreas* 23:368-374, 2001.

Motoo Y, Su SB, Xie MJ, Mouri H, Taga H, Sawabu N. Effect of herbal medicine keishi-to (TJ-45) and its components on rat pancreatic acinar cell injuries in vivo and in vitro. *Pancreatology* 1:102-109, 2001.

Moussa M, Garcia J, Ghisolfi J, Periquet B, Thouvenot JP. Dietary essential fatty acid deficiency differentially affects tissues of rats. *J Nutr* 126:3040-3045, 1996.

Murphy MG. Dietary fatty acids and membrane protein function. *J Nutr Biochem* 1:68-79, 1990.

Murray DK, Ruhmann-Wennhold A, Nelson DH. Dexamethasone effect on the phospholipid content of isolated fat cell ghosts from adrenalectomized rats. *Endocrinology* 105:774-777, 1979.

Nagao T, Kubo T, Fujimoto R, Nishio H, Takeuchi T, Hata F. Ca<sup>2+</sup>-independent fusion of secretory granules with phospholipase A<sub>2</sub>-treated plasma membranes in vitro. *Biochem J* 307:563-569, 1995.

Neelands PJ, Clandinin MT. Diet fat influences liver plasma-membrane lipid composition and glucagons-stimulated adenylate cyclase activity. *Biochem J* 212:573-583, 1983.

Nicolet T, Scemama JL, Pradayrol L, Berthélémy P, Seva C, Vaysse N. Putrescine and spermidine uptake is regulated by proliferation and dexamethasone treatment in AR4-2J cells. *Int J Cancer* 49:577-581, 1991.

Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP. International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol Rev* 51:745-781, 1999.

Ong WL, Jiang B, Tang N, Ling SF, Yeo JF, Wei S, Farooqui AA, Ong WY. Differential effects of polyunsaturated fatty acids on membrane capacitance and exocytosis in rat pheochromocytoma-12 cells. *Neurochem Res* 31:41-48, 2006.

Pavlov, JP. *Die arbeit der verdanungsdrusen*. Wiesbaden: Bergman, 1898.

Qiu X, Valentijn JA, Jamieson JD. Carboxyl-methylation of Rab3D in the rat pancreatic acinar tumor cell line AR42J. *Biochem Biophys Res Commun* 285:708-714, 2001.

Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Battino M, Mataix J. Physical exercise affects the lipid profile of mitochondrial membranes in rats fed virgin olive oil or sunflower oil. *Br J Nutr* 81:21-24, 1999.

Regimbald-Dumas Y, Arguin G, Fregeau MO, Guillemette G. cAMP-dependent protein kinase enhances inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca(2+) release in AR4-2J cells. *J Cell Biochem* 101:609-618, 2007.

Rehfeld JF, Hansen HF. Characterization of preprocholecystokinin products in the porcine cerebral cortex. Evidence of different processing pathways. *J Biol Chem* 261: 5832–5840, 1986.

Rinken A, Harro J, Engström L, Orelund L. Role of fluidity of membranes on the guanyl nucleotide-dependent binding of cholecystokinin-8S to rat brain cortical membranes. *Biochem Pharmacol* 55:423-431, 1998.

Rizvi IA, Robinson K, McFadden DW, Riggs DR, Jackson BJ, Vona-Davis L. Peptide YY reverses TNF-alpha induced transcription factor binding of interferon regulatory factor-1 and p53 in pancreatic acinar cells. *J Surg Res* 136:25-30, 2006.

Rosado JA, González A, Salido GM, Pariente JA. Effects of reactive oxygen species on actin filament polymerisation and amylase secretion in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* 14:547-556, 2002.

Rosewicz S, Riecken EO, Wiedenmann B. The amphicrine pancreatic cell line AR42J: A model system for combined studies on exocrine and endocrine secretion. *Clin Investig* 70:205-209, 1992.

Sankaran H, Goldfine ID, Bailey A, Licko V, Williams JA. Relationship of cholecystokinin receptor binding to regulation of biological functions in pancreatic acini. *Am J Physiol* 242:G250-257, 1982.

Satoh A, Gukovskaya AS, Edderkaoui M, Daghighian MS, Reeve JR Jr, Shimosegawa T, Pandol SJ. Tumor necrosis factor-alpha mediates pancreatitis responses in acinar cells via protein kinase C and proline-rich tyrosine kinase 2. *Gastroenterology* 129:639-651, 2005.

Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 259:315-324, 1989.

Soriguer FJ, Tinahones FJ, Monzon A, Pareja A, Rojo-Martínez G, Moreno F, Esteva I, Gómez-Zumaquero JM. Varying incorporation of fatty acids into phospholipids from muscle, adipose and pancreatic exocrine tissues and thymocytes in adult rats fed with diets rich in different fatty acids. *Eur J Epidemiol* 16:585-594, 2000.

Suarez A, Ramirez MC, Faus MJ, Gil A. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids influence tissue fatty acid composition in rats at weaning. *J Nutr* 126:887-897, 1996a.

Suarez A, Faus MJ, Gil A. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids modify heart, kidney, and lung fatty acid composition in weanling rats. *Lipids* 31:345-348, 1996b.

Swarovsky B, Steinhilber W, Scheele GA, Kern HF. Coupled induction of exocrine proteins and intracellular compartments involved in the secretory pathway in AR4-2J cells by glucocorticoids. *Eur J Cell Biol* 47:101-111, 1988.

Thiesen AL, Tappenden KA, McBurney MI, Clandinin MT, Keelan M, Thomson BK, Wild GE, Thomson AB. Cell and Molecular Biology Collaborative Network in Gastrointestinal Physiology. Dietary lipids alter the effect of steroids on transport of glucose after intestinal resection: Part II. Signalling of the response. *J Pediatr Surg* 38:575-578, 2003.

Vajreswari A, Narayanareddy K. Effect of dietary fats on some membrane-bound enzyme activities, membrane lipid composition and fatty acid profiles of rat heart sarcolemma. *Lipids* 27:339-343, 1992.

Varga G, Bálint A, Burghardt B, D'Amato M. Involvement of endogenous CCK and CCK1 receptors in colonic motor function. *Br J Pharmacol* 141:1275-1284, 2004.

Voisin T, Firar AE, Avondo V, Laburthe M. Orexin-induced apoptosis: the key role of the seven-transmembrane domain orexin type 2 receptor. *Endocrinology* 147:4977-4984, 2006.

Wang H, Dudley Jr AW, Dupont J, Reeds PJ, Hachey DL, Dudley MA. The duration of medium-chain triglyceride feeding determines brush border membrane lipid composition and hydrolase activity in newly weaned rats. *J Nutr* 126:1455-1462, 1996.

Wank SA, Pisegna JR, de Weerth A. Cholecystokinin receptor family. Molecular cloning, structure, and functional expression in rat, guinea pig, and human. *Ann NY Acad Sci* 713:49-66, 1994.

Wank SA. G protein-coupled receptors in gastrointestinal physiology. I. CCK receptors: An exemplary family. *Am J Physiol* 274:G607-G613, 1998.

Wank SA, Jensen RT, Gardner JD. Kinetics of binding of cholecystokinin to pancreatic acini. *Am J Physiol* 255:G106-112, 1988.

Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Mouri H, Sawabu N. Induction of chemokines in rat pancreatic acinar cell injury. *Pancreas* 24:198-204, 2002.

Yago MD, Diaz RJ, Martinez MA, Audi N, Naranjo JA, Martinez-Victoria E, Mañas M. Effects of the type of dietary fat on acetylcholine-evoked amylase secretion and calcium mobilization in isolated rat pancreatic acinar cells. *J Nutr Biochem* 17:242-249, 2006.

Yago MD, Diaz RJ, Ramirez R, Martinez MA, Mañas M, Martinez-Victoria E. Dietary-induced changes in the fatty acid profile of rat pancreatic membranes are associated with modifications in acinar cell function and signalling. *Br J Nutr* 91:227-234, 2004.

Yago MD, Martínez-Victoria E, Huertas JR, Manas M. Effects of the amount and type of dietary fat on exocrine pancreatic secretion in dogs after different periods of adaptation. *Arch Physiol Biochem* 105:78-85, 1997.

Yu JH, Kim KH, Kim H. Suppression of IL-1beta expression by the Jak 2 inhibitor AG490 in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Biochem Pharmacol* 72:1555-1562, 2006.

Yu S, Hao Y, Lowe AW. Effects of GP2 expression on secretion and endocytosis in pancreatic AR4-2J cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322:320-325, 2004.

Zenilman ME, Magnuson TH, Perfetti R, Chen J, Shuldiner AR. Pancreatic reg gene expression is inhibited during cellular differentiation. *Ann Surg* 225:327-332, 1997.



**Interleukin-6 effects on amylase secretion and calcium signalling in pancreatic AR42J cells: modulation by membrane fatty acid composition**

**AUDI N, SANTANA C, LÓPEZ-MILLÁN MB, MARTÍNEZ-BURGOS MA, MARTÍNEZ-VICTORIA E, MAÑAS M, YAGO MD.**

*Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology, University of Granada, C/ Ramón y Cajal 4, 18071 Granada, Spain*



## **1. Introduction**

Acute pancreatitis has been the subject of investigations for many years. In addition to the hypotheses of premature trypsinogen activation, changes in the cytoskeleton, the colocalization hypothesis, and the disruption of exocrine protein transport, cytokines have become a new focus in the investigation of the pathophysiology of pancreatitis (Tietz *et al.*, 2006). The pathways of damage are similar, whatever the etiology of pancreatitis, with three phases of progression: local acinar injury, systemic response, and generalized sepsis. The proinflammatory response is countered by an anti-inflammatory response, and an imbalance between these two systems leads to localized tissue destruction and distant organ damage. Although the exact underlying mechanisms have only begun to emerge, cytokines play a crucial role in the process of pancreatitis with the systemic complications like lung injury and multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Since MODS is the primary cause of morbidity and mortality in acute pancreatitis (Bhatia *et al.*, 2001), there is a great need to understand the pathophysiological processes leading to this fatal complication. Here, TNF $\alpha$  and IL-6 as proinflammatory cytokines play a predominant role (Bhatia *et al.*, 2004). It is not clear by which pathway cytokines trigger the cascade of inflammation.

The cytokines are a family of low-molecular weight proteins that are secreted by a multitude of cells. They are usually not found in normal tissue but are produced in response to stimuli via receptor-induced pathways. Cytokine secretion is a very closely regulated process and the expression of most cytokines is modulated by transcription factors such as nuclear factor kappa B (NFkappaB). All cytokines cause their effects via highly specific cell-surface receptors. Most cytokines have pleiotropic activity and show multiple functional effects on a variety of target cells. There is immense redundancy within the system such that many cytokines can share similar biologic effects and in the absence of any one cytokine, others can fill the gap (Makhija R & Kingsnorth AN, 2002).

Interleukin 6 (IL-6) is a cytokine that is produced in a spectrum of immunologically active cells, such as monocytes/macrophages, endothelial cells, and fibroblasts, in response to stimuli. During resting conditions, as much as a third of total circulating IL-6 is produced by adipose tissue (Mohamed-Ali *et al.*, 1997). It is also

produced in the pancreatic tissue after experimentally induced pancreatitis (Norman *et al.*, 1997) as well as by periacinar myofibroblasts in response to TNF $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Shimada *et al.*, 2002). IL-6 levels are elevated in pancreatitis and serve as markers of severity of pancreatitis, in addition to paralleling the course of the disease (Kingsnorth *et al.*, 1995; Leser *et al.*, 1991; Viedma *et al.*, 1992; Galloway *et al.*, 1994).

Aberrant cytosolic Ca<sup>2+</sup> flux in pancreatic acinar cells is critical to the pathological pancreatic zymogen activation observed in acute pancreatitis (Husain *et al.*, 2007); so it is possible that IL-6 exert its effects modulating cytosolic calcium concentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>, but it is not clear due to the different protocols and cells used for the studies. In cultured mouse skeletal muscle cells C(2)C(12) cell IL-6 increased intracellular Ca<sup>2+</sup>, and intracellular blockade of Ca<sup>2+</sup> with a Ca<sup>2+</sup> chelator reduced the IL-6-mediated increase in IL-6 mRNA levels (Weigert *et al.*, 2007). It is considered that IL-6 stimulates insulin secretion and preproinsulin mRNA expression perhaps via stimulating Ca<sup>2+</sup> influx in HIT-T 15 cells (Shimizu *et al.*, 2000). Viguerie *et al.* (1994) observed that the addition of IL-6 (400 pM) for 48 h to the pancreatic AR4-2J cells induced no change in the binding affinities but there was a 2 fold increase in the binding capacity of cholecystokinin (CCKA R) and gastrin (CCKB R) receptors. Although IL-6 treatment did not change directly the secretory capacity and did not activate the intracellular calcium mobilization of AR4-2J, it indirectly increased the sensitivity of the cells to the stimulation of amylase release and the intracellular calcium mobilization by cholecystokinin and gastrin. It is most likely this effect was due to the IL-6-induced increase in the numbers of CCKA R and CCKB R. On the other hand, in submandibular gland cell line, SMG-C6, Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores was strongly stimulated by acetylcholine (ACh) and ATP, but not by norepinephrine (NA), epidermal growth factor (EGF), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) (Liu *et al.*, 2000). Dawson *et al.* (2000) examined several aspects of Ca<sup>2+</sup> mobilization that might be altered by chronic exposure to cytokines: Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores; Ca<sup>2+</sup> influx; Ca<sup>2+</sup> extrusion; and the complex interaction of Ca<sup>2+</sup> release and reuptake. And they found that exposure of isolated submandibular acinar cells to range of cytokines (including IL-6) found in conditioned medium had no measurable effect on any aspect of Ca<sup>2+</sup> mobilization and is unlikely to cause inhibition of fluid secretion in these cells.

Doses of cholecystokinin (CCK) or cerulein beyond those that cause the maximum pancreatic secretion of amylase result in pancreatitis (Ju *et al.*, 2006). CCK-receptor stimulation and especially hyper-stimulation upon CCK at supramaximal doses lead to the NF- $\kappa$ B activation of the stress pathways in pancreatic acinar cells (Steinle *et al.*, 1999). Yu *et al.* (2002) found that cerulein, a CCK analogue, produces large amounts of reactive oxygen species (ROS), activates NF- $\kappa$ B and thus induces IL-6 expression in freshly isolated pancreatic acinar cells. Yu *et al.* (2005) also showed that cerulein increased NADPH oxidase activity and induced NF- $\kappa$ B activation and IL-6 expression in AR42J cells. A recent study shows that intracellular pathways are activated by the CCK2 receptor in pancreatic AR42J cells (Ferrand *et al.*, 2005). Therefore, high doses of CCK might trigger this pathway that is involved in the induction of IL-6 in pancreatic acinar cells.

Fatty acid composition of the diet plays a critical role in determining the tissue fatty acid composition (Gibney & Hunter, 1993; Mantizioris *et al.* 1995); the ratios between different classes of dietary fatty acids rather than their absolute amounts are more important in determining their effects on tissue fatty acid composition. In addition to their many physiological roles (growth, reproduction, and brain and eye functions), fatty acids are structural components of cell membranes, required for the growth and maintenance of immune cells, and produced and secreted during immune cell activation. Fatty acids can alter immune and inflammatory responses. Any single dietary intervention can involve one or more of the following mechanisms (Kelley, 2001): alteration of serum-lipoprotein profile; modulation of the eicosanoid type and concentration produced; oxidative stress which can cause lipid peroxidation that modulate a number of genes involved in the inflammatory response; changes in membrane fluidity, which increases with the increase in desaturation of membrane lipids, changes in membrane fluidity can affect intercellular interaction, receptor expression, nutrient transport and signal transduction; interaction with nuclear transcription factors as fatty acids and their oxidation products are the ligands for the peroxisome proliferator-activated receptors, those receptors regulate a variety of anabolic and catabolic functions in different cell types.

As a consequence of alterations in phospholipid composition, membrane fluidity may change, altering binding of cytokines to receptors and G protein activity. The

nature of substrate for various signalling pathways associated with cytokine production and actions may also be changed. Consequently, alterations in eicosanoid production and activation of protein kinase C may occur (Grimble & Tappia, 1998). Our group has demonstrated (Matínez *et al.*, 2004; Yago *et al.*, 2004) that the type of dietary fat strongly influences the fatty acid composition of rat pancreatic cell membranes and this is associated with changes in the functionality of viable pancreatic acini. AR42J cell line is a useful tool to assess the effect of membrane compositional changes on acinar cell function (Audi *et al.*, 2007). Our aim was to study the effects of treatment with IL-6 on amylase secretion and calcium homeostasis in AR42J cells, and to elucidate if these effects are influenced by different membrane fatty acid composition.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Cultivo Celular**

Las células AR42J se cultivaron en las condiciones que se especifican en el apartado general de Materiales y Métodos (ver página 29). Las células AR42J fueron sometidas a los siguientes tratamientos de forma individual o combinados:

- a) Tratamiento de 72 h con 100 nM de dexametasona (DX) adicionada al medio de cultivo para inducir la diferenciación hacia el fenotipo exocrino (Bozem *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2003).
- b) Se indujeron modificaciones en los ácidos grasos (AG) de las membranas de las células AR42J durante las 72 h del periodo de diferenciación, de acuerdo con lo descrito previamente (Audi *et al.*, 2007). El medio de cultivo se enriqueció en 18:1 n-9 o 18:2 n-6 para obtener las células del grupo AR42J-O y AR42J-L, respectivamente. La concentración final en el medio de cultivo de los AG adicionados fue de 50  $\mu$ M. Las células control (AR42J-C) se cultivaron en un medio de cultivo que contenía un suero fetal bovino sin ácidos grasos adicionados.
- c) Las células (AR42J-C, AR42J-O y AR42J-L) con diferente composición en AG del medio de cultivo se expusieron o no a IL-6 (400 pM) adicionada al medio de cultivo en las 48 h previas a los experimentos.

En el siguiente cuadro se muestra un esquema de los distintos tratamientos a los que se sometieron las células en este trabajo previos a los ensayos. Al final del periodo de incubación las células se transportaron a nuestro laboratorio donde se llevaron a cabo los experimentos.

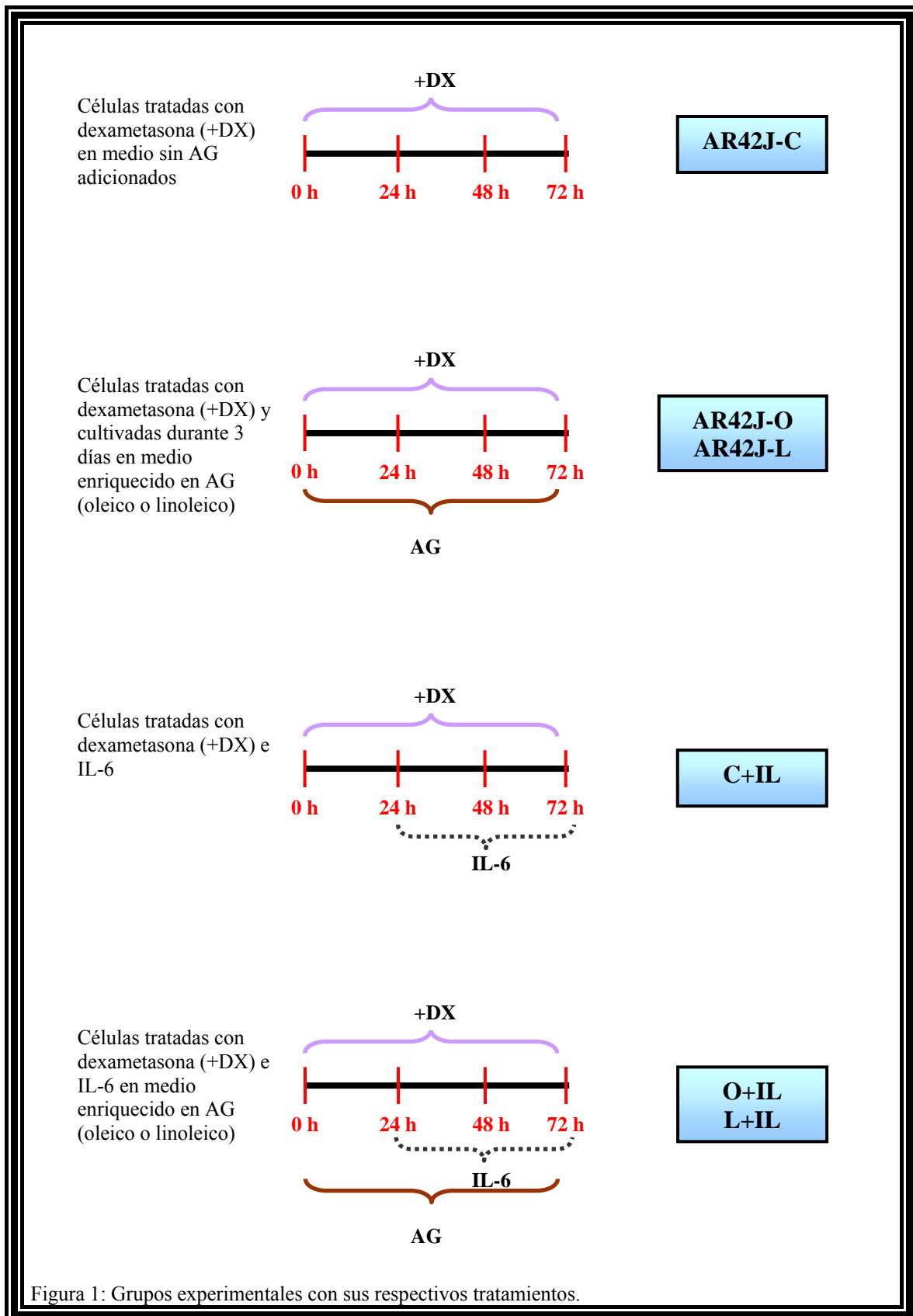


Figura 1: Grupos experimentales con sus respectivos tratamientos.

## 2.2 Secreción de Amilasa

Tras cada uno de los tratamientos descritos, las células se incubaron a 37 °C durante 50 min con medio de incubación (basal) o con distintas concentraciones ( $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M) del octapéptido de colecistoquinina (CCK-8) y se analizó la actividad amilásica basal (% total) y la secreción neta estimulada de amilasa (% total) de acuerdo con el apartado general de Materiales y Métodos (ver página 32).

## 2.3 Determinación de la Concentración Citosólica de $Ca^{2+}$

Se determinó la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  [ $Ca^{2+}$ ]<sub>c</sub> en células sometidas a los distintos tratamientos según se describe en el apartado general de Materiales y Métodos (ver página 36).

## 2.4 Cálculos y Análisis Estadístico

Para calcular la respuesta integrada de cada experimento de  $Ca^{2+}$ , se calculó el valor medio del ratio (350/385) en situación basal (previo a la adición de CCK-8), y este valor se restó a cada uno de los valores en situación de estimulación. Los números obtenidos de esta manera se sumaron. Se usó el mismo número de puntos en todas las células para calcular el área bajo la curva.

A no ser que se indique lo contrario, los resultados en el texto, tablas y gráficas se expresan como media  $\pm$  E.E.M. Para las variables con una distribución normal, se aplicó el test de Levene de homogeneidad de varianzas, examinándose posteriormente las diferencias entre los diferentes grupos mediante un ANOVA de una vía (Procedimiento one-way de SPSS), utilizando como test a posteriori (*post hoc*) el de la Diferencia Menos Significativa (Least Significant Difference, LSD), y el de Tukey's HSD (honestly significant difference) cuando la variable independiente tenía más de 2 categorías, o mediante el test de a t de Student para variables independientes de dos categorías.

Se consideraron significativas aquellas diferencias con valores de  $p < 0.05$ . Para el análisis estadístico se utilizó la aplicación informática SPSS para Windows.



### 3. Resultados

#### 3.1 Secreción de Amilasa en Células Incubadas o No con IL-6

**AR42J-C vs. C+IL.** Cuando comparamos células AR42J diferenciadas con dexametasona que se han cultivado en ausencia (AR42J-C) o presencia de IL-6 (C+IL) observamos una secreción basal de amilasa mayor en ausencia de IL-6 (AR42J-C). Si estudiamos la secreción neta de la enzima no hay diferencias entre los dos grupos.

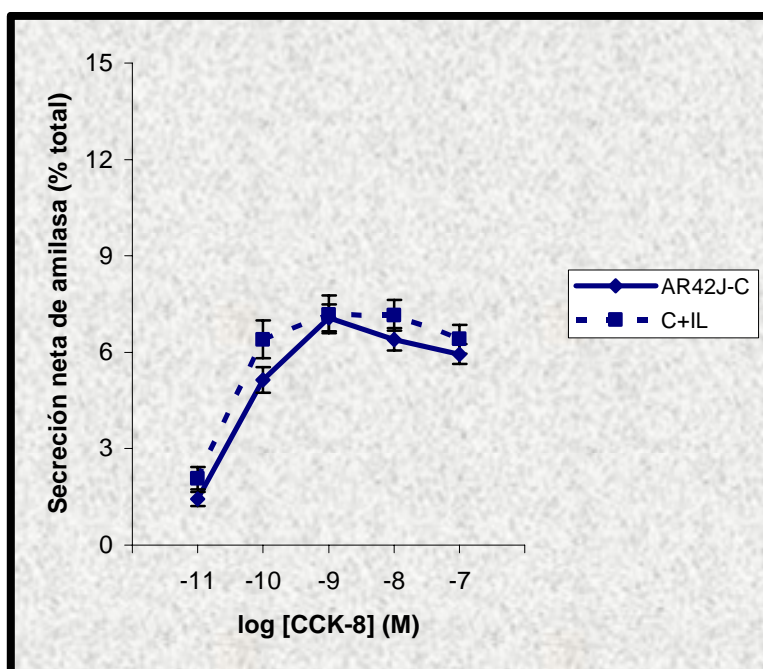


Figura 2: Secreción neta de amilasa (incremento sobre la secreción basal) estimulada por el octapéptido de colecistoquinina (CCK-8) en células AR42J diferenciadas cultivadas en presencia (C+IL) o ausencia (AR42J-C) de IL-6. La secreción de amilasa secretada durante la incubación (37 °C, 50 min) está expresada como porcentaje del contenido inicial total. Los errores estándares de la media están representados por líneas verticales. No existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

**AR42J-O vs. O+IL.** En células con membranas enriquecidas en MUFA vemos diferencias significativas en la secreción basal de amilasa. En cuanto a la secreción neta estimulada, es mayor en células AR42J-O que en O+IL, esta diferencia es significativa entre los dos grupos cuando se estimulan con concentraciones de  $10^{-8}$  M de CCK-8.

**AR42J-L vs. L+IL.** Cuando comparamos células con membranas enriquecidas en ácido linoleico sometidas o no a la acción de IL-6 no hallamos diferencias en la secreción de amilasa ni en situación basal ni estimulada con CCK-8.

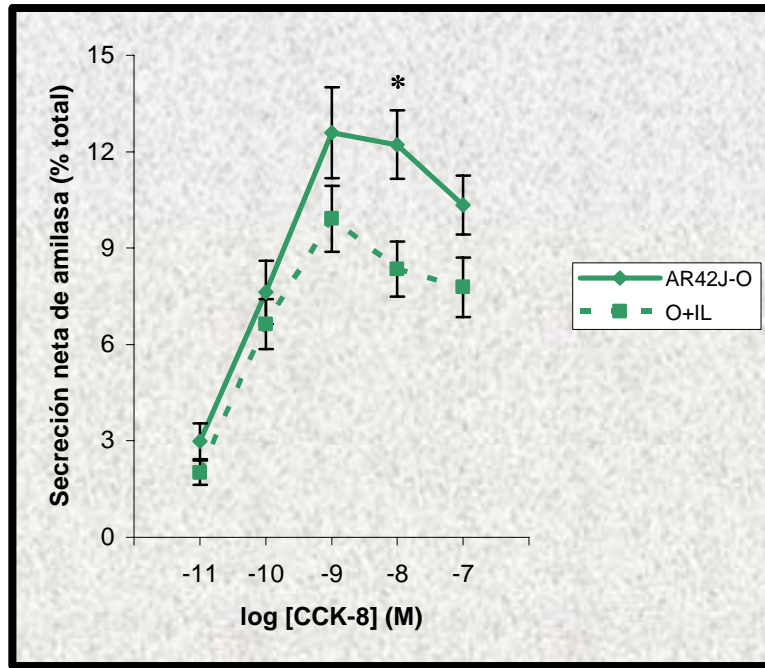


Figura 3: Secreción neta de amilasa (incremento sobre la secreción basal) estimulada por el octapéptido de colecistoquinina (CCK-8) en células AR42J diferenciadas cultivadas en medio enriquecido en ácido oleico en presencia (O+IL) o ausencia (AR42J-O) de IL-6. La secreción de amilasa secretada durante la incubación (37 °C, 50 min) está expresada como porcentaje del contenido inicial total. Los errores estándares de la media están representados por líneas verticales. \*  $p < 0.05$  entre los grupos.

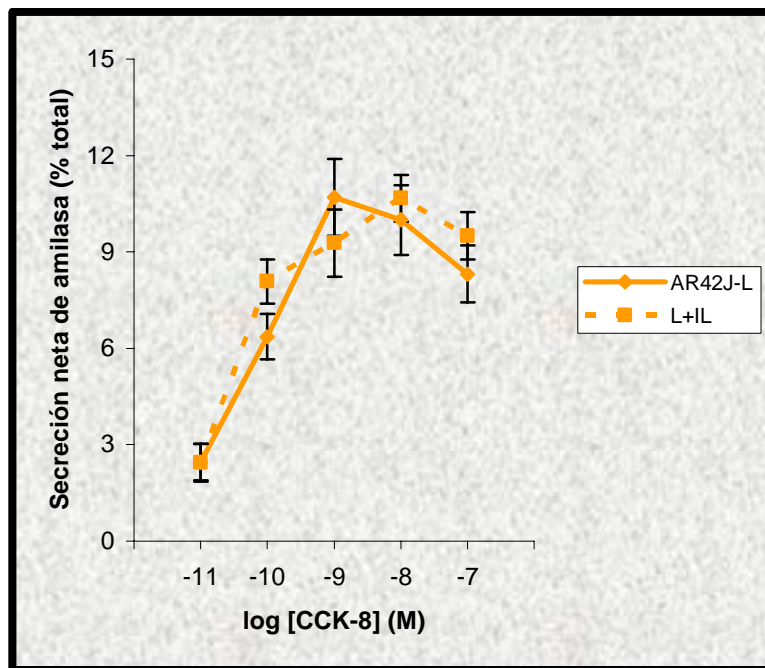


Figura 4: Secreción neta de amilasa (incremento sobre la secreción basal) estimulada por el octapéptido de colecistoquinina (CCK-8) en células AR42J diferenciadas cultivadas en medio enriquecido en ácido linoleico en presencia (L+IL) o ausencia (AR42J-L) de IL-6. La secreción de amilasa secretada durante la incubación (37 °C, 50 min) está expresada como porcentaje del contenido inicial total. Los errores estándares de la media están representados por líneas verticales. No existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

### 3.2 Secreción de Amilasa en Células Incubadas con IL-6 y con Distinto Perfil de Membranas

**C+IL vs. O+IL vs. L+IL.** Cuando comparamos C+IL frente a O+IL observamos que la secreción neta de amilasa es similar excepto a 1nM de CCK-8. Cuando comparamos C+IL frente a L+IL la secreción neta obtenida es mayor en L+IL cuando la dosis de CCK-8 es alta ( $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M). Entre O+IL y L+IL la secreción neta sólo se diferencia para concentraciones de  $10^{-8}$  M de CCK-8.

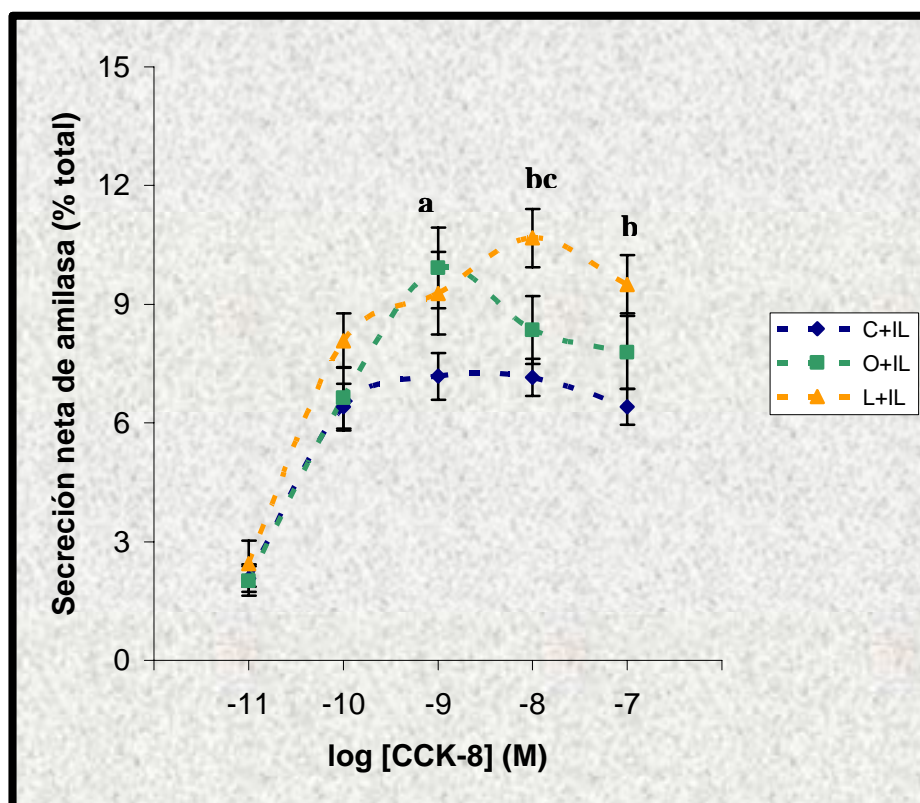


Figura 5: Secreción neta de amilasa (incremento sobre la secreción basal) estimulada por el octapéptido de colecistoquinina (CCK-8) en células AR42J diferenciadas, cultivadas en medio enriquecido con diferentes AG (FCS no modificado: C+DX; FCS enriquecido en ácido oleico: O+DX enriquecido en ácido linoleico: L+DX) y en presencia de IL-6 (48 h). La secreción de amilasa secretada durante la incubación (37 °C, 50 min) está expresada como porcentaje del contenido inicial total. Los errores estándares de la media están representados por líneas verticales. Significaciones estadísticas ( $p < 0.05$ ): Significaciones estadísticas: a: C+IL vs. O+IL; b: C+IL vs. L+IL; c: O+IL vs. L+IL.

### 3.3 Determinación de Calcio Citosólico

En todo los grupos estudiados hemos observado que tras la estimulación de las células marcadas con fura-2 AM con 1nM de CCK-8 se produjo un rápido y transitorio incremento de la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  [ $Ca^{2+}$ ]<sub>c</sub>, tras el cual disminuyó la

$[Ca^{2+}]_c$  hasta un estado estable ligeramente superior al nivel de preestimulación; siendo de 1mM la concentración extracelular de  $Ca^{2+}$   $[Ca^{2+}]_o$ .

Tras estimular con CCK-8 no hemos hallado diferencias significativas en el incremento del pico máximo obtenido en cada grupo experimental (tabla 1). Sin embargo sí que existen diferencias en cuanto a los tiempos de respuesta al secretagogo y al área bajo la curva como se puede observar en las siguientes figuras (6 y 7).

Grupos	<i>n</i>	Magnitud del pico (ratio 350/385)
Control ( <i>n</i> 28)	28	2.19 ±0.052
C+IL-6 ( <i>n</i> 28)	28	2.03 ±0.084
Oleic ( <i>n</i> 44)	44	2.21 ±0.086
O+ IL-6 ( <i>n</i> 39)	39	2.13 ±0.104
Linoleic ( <i>n</i> 42)	42	2.19 ±0.111
L+ IL-6 ( <i>n</i> 29)	29	2.15 ±0.098

Tabla 1: Respuesta de  $Ca^{2+}$  estimulada por una percusión de CCK-8 (1 nM) en células AR42J con diferente perfil de ácidos grasos de membrana tratadas o no con IL-6. *n* es el número de células monitorizadas en cada grupo. No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos en la magnitud del pico de ratio 350/385 tras la estimulación. Los datos son la media±E.E.M.

Las células AR42J-C son las que han respondido como media antes en el tiempo, y las AR42J-O las que tardan más en responder a la acción de la CCK-8 en lo que respecta a la concentración citosólica de calcio. Vemos que los grupos tratados con IL-6 tardan prácticamente el mismo tiempo en responder independientemente del grupo considerado.

En cuanto al área bajo la curva, que representa la concentración citosólica total de calcio  $[Ca^{2+}]_c$  tras la estimulación, es significativamente mayor en AR42J-L frente a AR42J-C y AR42J-O. Las células con membranas incubadas en suero no modificado (AR42J-C) ven incrementada, significativamente, la concentración de calcio al tratarlas con IL-6 (C-IL); por el contrario, en las células con membranas más poliinsaturadas al tratarlas con IL-6 disminuye significativamente la  $[Ca^{2+}]_c$ . En células con membranas monoinsaturadas no hay cambios en la  $[Ca^{2+}]_c$  a consecuencia del tratamiento con IL-6. En C+IL el área bajo la curva es máxima, siendo significativamente diferente de O+IL y L+IL.

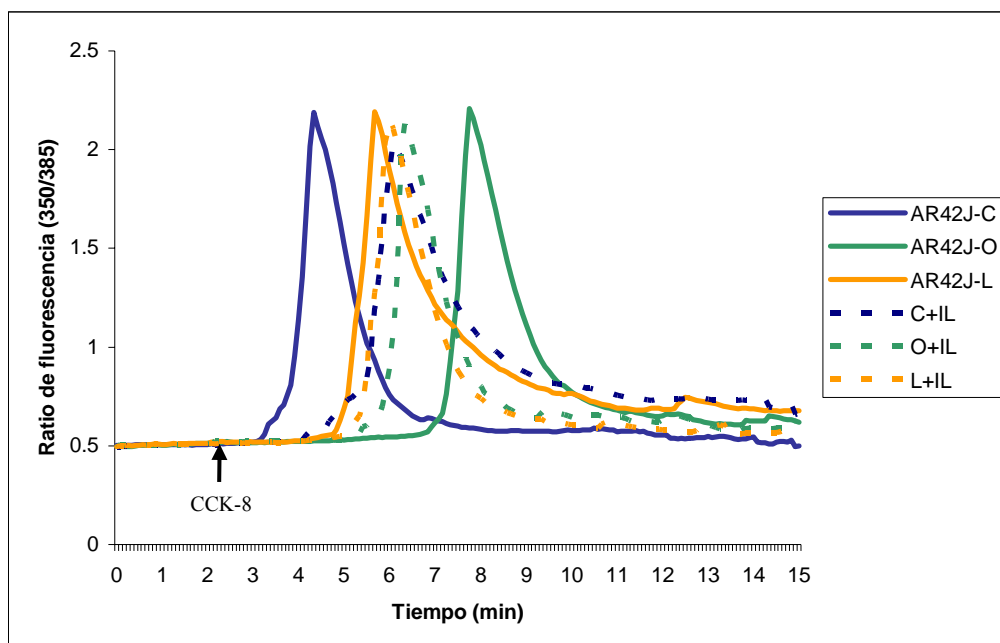


Figura 6: Cambios de  $[Ca^{2+}]_c$  a lo largo del tiempo en células AR42J cargadas con fura-2 AM que se cultivaron en medio con diferente composición de ácidos grasos y en presencia o ausencia de IL-6. Tras 2 min de perfusión con una solución de Na-HEPES que no contenía proteínas, las células se estimularon con 1 nM de CCK-8 hasta el final del experimento.  $[Ca^{2+}]_o$  fue 1 mM. Las curvas representan los valores medios de 28-44 células individuales. Los valores se expresan en ratio 350/385.

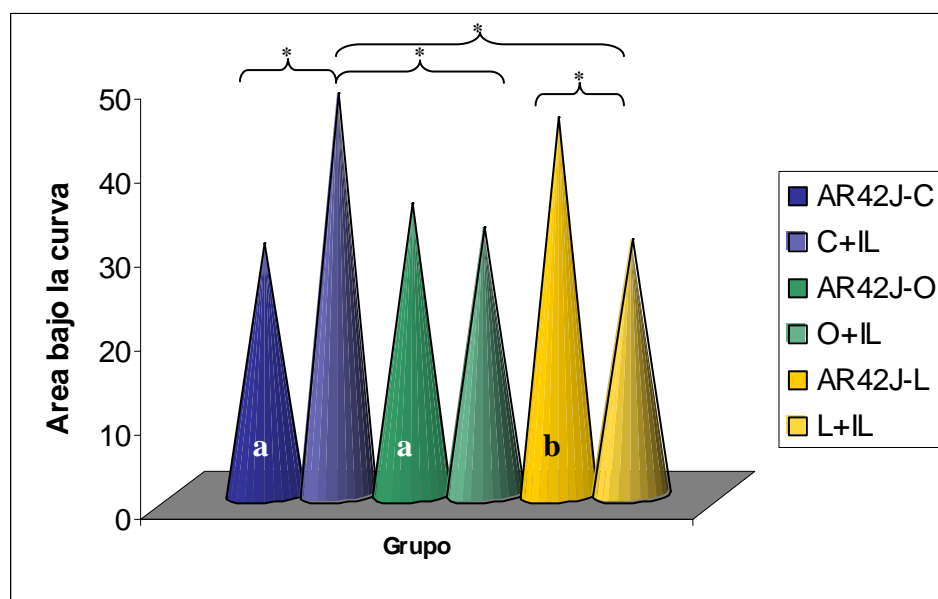


Figura 7: Representa la media del área bajo la curva de cada grupo experimental ( $n$ : 28-44) tras la estimulación con CCK-8. \*  $p < 0.05$  entre los grupos. Diferentes letras en los conos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos cultivados en ausencia de IL-6.

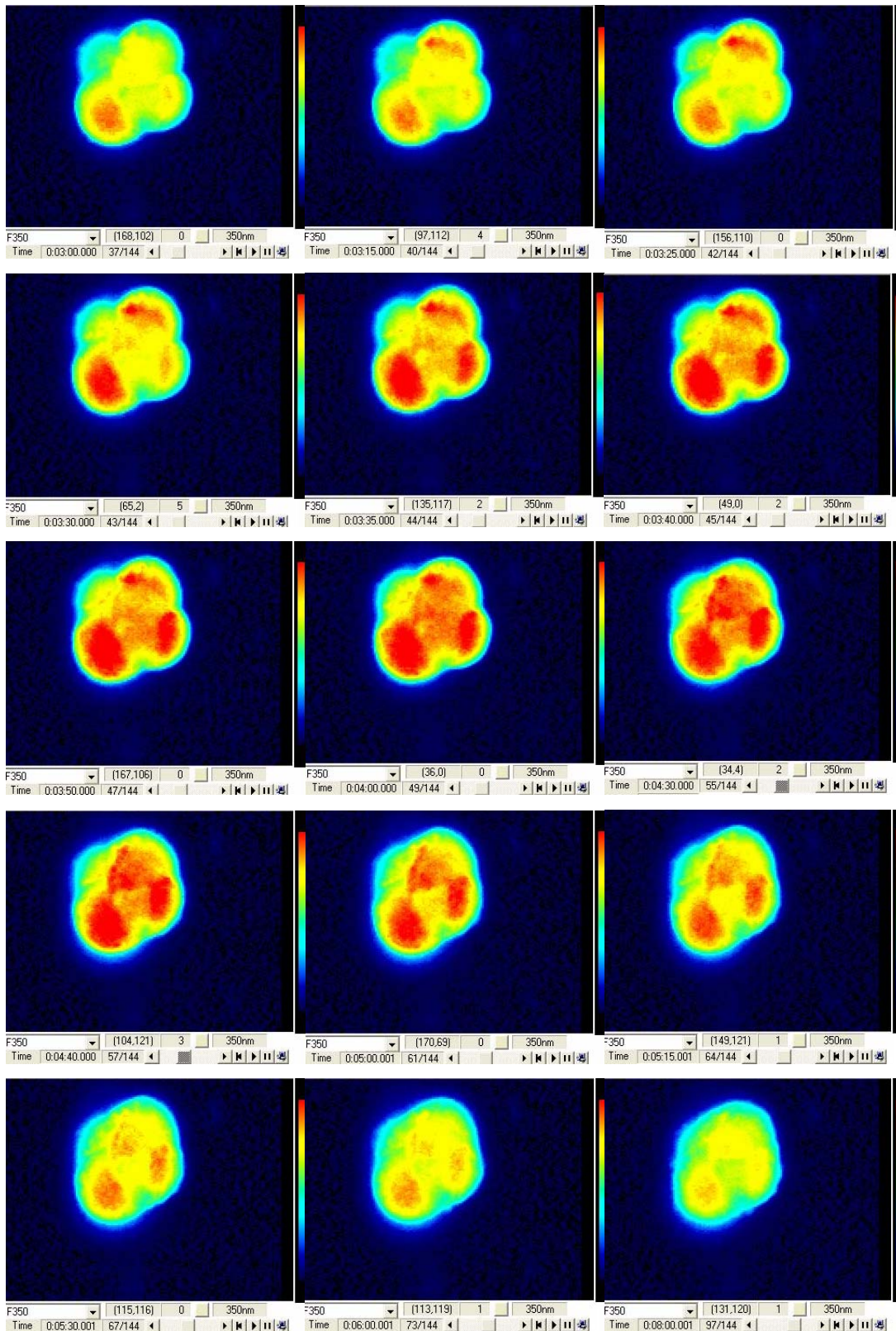


Figura 8: Serie de imágenes de ratio de emisión de fluorescencia de células AR42J cargadas con fura-2 AM. Las imágenes proceden de un experimento representativo. La primera imagen es previa a la estimulación, las restantes son tras una perfusión de CCK-8 1 nM. Los colores varían desde azul hasta rojo, indicando baja y alta  $[Ca^{2+}]_i$ , respectivamente.

#### **4. Discusión**

Para determinar cambios en los niveles de calcio citosólico hemos usado la dosis de 1 nM de CCK-8 debido, por un lado, a que esta dosis es la que produce la respuesta máxima en cuanto a secreción de amilasa y concentración de calcio citoplasmático (Viguerie *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 2005); y por otro lado, a que en muchos casos, las aproximaciones de pico máximo y área bajo la curva de la señal de calcio citoplasmático son más fiables cuando se enfrentan a respuestas que son espacial y temporalmente simples, como las que se producen por activación máxima del receptor con concentraciones farmacológicas de agonistas. Además, la activación del receptor bajo condiciones más fisiológicas podría conducir a cambios espaciales y temporales en la concentración de calcio citosólico  $[Ca^{2+}]_c$  complejos u oscilaciones de calcio, por lo que se tendrían que cuantificar muchos parámetros adicionales.

Tras la estimulación de las células AR42J-C cargadas con fura-2 AM con 1nM de CCK-8 se produjo un rápido y transitorio incremento de  $[Ca^{2+}]_c$ , tras el cual, en unos minutos disminuyó la  $[Ca^{2+}]_c$  hasta un estado estable ligeramente superior al nivel de preestimulación; siendo de 1mM la  $[Ca^{2+}]_o$ . Este comportamiento es similar al descrito por otros autores en células AR42J (Viguerie *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 2005), y además es similar a la respuesta en células acinares pancreáticas de ratas (Yago *et al.*, 2004; Rosado *et al.*, 2002; Bragado *et al.*, 1996).

No hemos encontrado en bibliografía trabajos en los que se estudien en células AR42J con distinto perfil lipídico de membrana respuestas de movilización de calcio intracelular. Sí existe información sobre movimientos de calcio en respuesta a distintos secretagogos en células acinares pancreáticas de ratas alimentadas con dietas que varían en su fuente de grasa (Yago *et al.*, 2006, 2004; Martínez *et al.*, 2004; Díaz, 2003). En estos experimentos encontramos que, a 1 nM de CCK-8, el pico de calcio es mayor en ratas alimentadas con dietas ricas en aceite de oliva respecto a aquellas alimentadas con un pienso estándar o una dieta rica en aceite de girasol.

En nuestras condiciones experimentales, al estudiar la respuesta a CCK-8 de células AR42J con diferente perfil lipídico de membrana, no hemos encontrado diferencias en el pico máximo de ratio F350/F385, el cual refleja la máxima  $[Ca^{2+}]_c$  que

se alcanza. Estos datos difieren de los observados previamente (Yago *et al.*, 2004, Martínez-Victoria *et al.*, 2003) en acinos pancreáticos de rata que al estimularlos con CCK-8 (1 nM) producían un incremento sobre la concentración basal de calcio mayor en ratas adaptadas a dietas ricas en aceite de oliva que en ratas adaptadas a dietas ricas en aceite de girasol o pienso estándar.

Aunque no hemos encontrado diferencias en cuanto al pico máximo, sí hemos comprobado, en células AR42J, que un perfil de membrana diferente da lugar a diferencias en el área bajo la curva de la respuesta de calcio a CCK-8. Hemos observado que este parámetro es significativamente mayor en las células AR42J-L frente a AR42J-C y AR42J-O. Estas diferencias en el área bajo la curva no se correlacionan con la secreción neta de amilasa a 1 nM de CCK-8, que hemos comentado anteriormente, en la que veíamos que es similar en AR42J-O y AR42J-L, y es significativamente más baja para AR42J-C.

En acinos pancreáticos de ratas adaptadas a diferentes grasas dietéticas (Yago *et al.*, 2004) la secreción de amilasa estimulada con CCK-8 se correlacionaba con las respuestas de calcio estimuladas por este secretagogo. Sin embargo, en ratas estimuladas con otro secretagogo, como la acetilcolina (ACh), había una falta de correlación positiva entre los incrementos de calcio sobre el basal y la secreción de amilasa (Martínez *et al.*, 2004).

Las células con membranas enriquecidas en ácido oleico son siempre las que muestran mayor secreción neta de amilasa, tanto en células AR42J estimuladas con diferentes dosis de CCK-8, como en células acinares de rata estimuladas con este mismo secretagogo (Martínez *et al.*, 2004; Yago *et al.*, 2004) o con ACh (Yago *et al.*, 2006). En general, observamos que los patrones de secreción de amilasa no siempre se correlacionan con los cambios en  $[Ca^{2+}]_c$ . Esto es lógico puesto que existen vías no dependientes de la elevación citosólica de calcio que son importantes en la secreción de amilasa. Una elevación del calcio citosólico puede ser necesaria para una completa manifestación de la secreción de amilasa inducida por CCK-8, pero por sí misma es insuficiente para inducir la secreción de amilasa en células AR42J (Zhou *et al.*, 1999). Además, los tiempos de aplicación del secretagogo son diferentes en las medidas que hemos realizado de secreción de amilasa y de liberación de calcio citosólico. Se han



propuesto dos fases de exocitosis: una fase inicial que se completa a los 5 min de la estimulación celular, y una fase sostenida a lo largo de la estimulación con el agonista. La primera fase está mediada por un incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$ , mientras que la segunda fase se asocia a la estimulación de proteína kinasa C (PKC) (Pandol *et al.*, 1985; Williams & Blevins, 1993). Se ha postulado que la primera fase representa la fusión de gránulos preparados, ya listos para la exocitosis, que hay en la vecindad de la membrana plasmática, mientras que la segunda fase se refiere a la liberación del *pool* de reserva.

El cambio del perfil lipídico de la membrana sigue produciendo, al igual que en células acinares de rata (Martínez *et al.*, 2004; Yago *et al.*, 2004), diferente movilización de calcio intracelular en función del ácido graso con el que se enriquezcan las membranas.

Un paradigma general de la señalización del calcio es una regulación coordinada de la liberación del ión calcio intracelular y de la entrada de ión calcio a través de la membrana plasmática de la célula. Es bien sabido que en células no excitables, la activación del receptor acoplado al sistema fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PI-PLC) por neurotransmisores y hormonas estimula un proceso de señalización de  $Ca^{2+}$  que es bifásico, con una liberación inicial de iones calcio hacia el citoplasma desde un orgánulo intracelular, seguida por la entrada de iones calcio hacia el citoplasma a través de la membrana plasmática. La primera fase de la liberación de calcio a menudo se atribuye al inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ), el más extendido de los mecanismos de liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular. El  $IP_3$  actúa por unión a un receptor específico en el retículo endoplasmático (ER) o posiblemente a un componente especializado del ER. Sin embargo, hay otros mecanismos potenciales para el control de la liberación de calcio intracelular, incluyendo receptores de rianodina, ADP ribosa cíclica y NAADP. En las vías de señalización que implican PI-PLC, la segunda fase de la entrada de calcio se atribuye, generalmente, a una “entrada capacitativa de calcio” (CCE), un proceso de señalización retrógrada tal que los orgánulos de almacenamiento de calcio vacíos producen una señal para la entrada del ión calcio extracelular a través de la membrana plasmática. La naturaleza de la señal retrógrada y los canales diana de la membrana plasmática que sustentan la CCE todavía están pobremente definidos. Sin embargo, los canales asociados con CCE se han caracterizado electrofisiológicamente, y aunque no se conocen los canales que intervienen en la CCE, distintos estudios apuntan como

candidatos a los miembros de la superfamilia TRP (*transient receptor potential*), en particular miembros de las superfamilias TRPC y TRPV (Bird & Putney, 2006).

Los canales TRP (*transient receptor potencial*) son una superfamilia de canales iónicos funcionalmente versátiles presentes en casi todos los tipos celulares de mamíferos. Aunque inicialmente se propuso que eran canales de calcio operados por almacenes, estudios recientes muestran que exhiben una gran variedad en sus aspectos reguladores y funcionales (Desai & Clapham, 2005). El miembro prototipo (dTRP) se identificó en *Drosophila*, activado al final de una cascada iniciada por una proteína Gq acoplada a fosfolipasa C (PLC). La mayoría de los canales TRP están sujetos a múltiples modos de regulación, pero un factor común entre las subfamilias TRPC/V/M es su regulación por mensajeros lipídicos (Hardie, 2007). La evidencia basada en estudios genéticos apoya un papel excitador del diacilglicerol (DAG) para los dTRP, aunque curiosamente, sólo los metabolitos de DAG (PUFAs) han demostrado activar los canales de *Drosophila*. Se acepta que TRPC2,3,6 y 7 son canales activados por DAG, aunque TRPC3 también puede ser regulado por un mecanismo operado por almacenes. Más recientemente se ha observado que se requiere PIP<sub>2</sub> (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) para la actividad de TRPV5, TRPM4,5,7 y 8, mientras que esta molécula podría inhibir los canales TRPV1 y los dTRPs (Hardie, 2007). Tanto el potencial de membrana como el nivel de PIP<sub>2</sub> son reguladores eficaces de la apertura de canales TRP (Nilius *et al.*, 2007).

Trabajos recientes han mostrado que esta regulación es aplicable a varios miembros de las subfamilias TRPV (*TRP vanilloid*: TRPV1 y TRPV5) y TRPM (*TRP melastatin*: TRPM4/TRPM5/TRPM7/TRPM8), mientras que la regulación de los miembros de la subfamilia TRPC todavía se discute. El mecanismo por el cual PIP<sub>2</sub> actúa sobre TRPM4, un canal activado por Ca<sup>2+</sup> y por voltaje, se ha descrito recientemente (Nilius *et al.*, 2007): (i) PIP<sub>2</sub> se puede unir directamente al canal, (ii) PIP<sub>2</sub> sensibiliza frente a la activación por Ca<sup>2+</sup>, y (iii) PIP<sub>2</sub> desplaza la dependencia de voltaje hacia potenciales negativos fisiológicamente más relevantes. Por otro lado, el estrés oxidativo describe el daño causado a las células resultante de un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o descenso de la reserva antioxidante. Las ERO pueden actuar sobre macromoléculas como DNA, proteínas y lípidos causando un amplio daño a las estructuras celulares y eventualmente la muerte

celular. Se sabe que al menos 4 canales TRP, TRPC3, TRPC4, TRPM2, y TRPM7, se activan por estrés oxidativo (Yao & Garland, 2005).

Etanol (Trevisani *et al.*, 2002), nicotina (Liu *et al.*, 2004) y citoquinas (Zhang *et al.*, 2005) también producen cambios en el umbral de activación de TRPV1 y en la potenciación de las respuestas mediadas por capsaicina.

Por tanto, se podría afirmar que la altura del pico representa la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, que sería la primera fase de la señal de calcio. En nuestro caso, en el que todos los grupos de células AR42J estudiados tenían la misma magnitud del pico de calcio, se podría afirmar que el área bajo la curva representa la segunda fase de la señalización de calcio. Por tanto, podríamos atribuir las diferencias en el área bajo la curva a diferencias en la entrada de calcio en la célula desde el medio extracelular. Esto es lógico puesto que distintos perfiles lipídicos de la membrana podrían modular la actividad de los canales asociados con CCE, como los canales TRP que acabamos de comentar.

Hemos observado también diferencias en los tiempos de respuesta a secretagogo en cuanto a movilización de calcio, estas diferencias se podrían atribuir a posibles efectos del distinto perfil lipídico de la membrana sobre el retardo o adelantamiento en el tiempo en la respuesta de calcio a CCK-8. No podemos, sin embargo, descartar pequeñas diferencias en la velocidad de perfusión del secretagogo a pesar de que ésta se controló rigurosamente.

Cuando las células AR42J se trataron con IL-6 no se modificó el pico de calcio, pero sí hubo diferencias significativas en el área bajo la curva. En este caso las diferencias significativas las encontramos entre AR42J-C vs. C+IL y entre AR42J-L vs. L+IL. Al tratarlas con IL-6, el área bajo la curva aumentó en C+IL y disminuyó en L+IL, mientras que en las células AR42J-O su área bajo la curva se vio poco alterada tras la adición de IL-6 al medio de cultivo.

En lo que respecta a la secreción basal de amilasa, en células cultivadas durante 48 h en presencia de IL-6, ésta disminuye en C+IL y O+IL respecto a células con estas mismas membranas pero sin tratar con IL-6 (AR42J-C y AR42J-O, respectivamente).

En el caso de células con membranas ricas en ácido linoleico, la secreción basal de amilasa es la misma independientemente de si había (L+IL) o no (AR42J-L) IL-6 en el medio de cultivo. Aunque en estudios de pancreatitis (Okada *et al.*, 1998; Bragado *et al.*, 1996; Niederau *et al.*, 1990) suele aumentar la secreción basal de amilasa, y la IL-6 se considera un marcador de esta enfermedad, nosotros observamos el efecto contrario, es decir, no vemos un aumento en la secreción basal. Por tanto, posiblemente sean otros factores inflamatorios o la presencia de ERO los que producen daño celular y aumento en la secreción de amilasa durante la pancreatitis. De hecho, Cuzzocrea *et al.* (2002), en estudios en ratones *knockout* para IL-6 usando un modelo de pancreatitis producida por ceruleína, describen un posible efecto antiinflamatorio de la IL-6. Puede ser por un lado, que IL-6 no esté implicada en el daño celular ni en la secreción enzimática, o por otro lado, que tenga un papel antiinflamatorio.

En cuanto a la actividad amilásica neta tras estimular con distintas dosis de CCK-8 observamos que en células con las membranas más monoinsaturadas siempre hay una disminución al tratarlas con IL-6 (O+IL) que alcanza valores significativos a dosis  $10^{-8}$  M de CCK-8; mientras que en células con membranas no modificadas o más poliinsaturadas no varía significativamente al tratarlas con esta citoquina (C+IL y L+IL) respecto a las correspondientes células sin tratar (AR42J-C y AR42J-L).

A pesar de que no se modificó la secreción neta, en células AR42J-C tratadas con IL-6 vemos, que no se produce la típica curva dosis-respuesta de amilasa, puesto que no encontramos diferencias en las respuestas a distintas concentraciones de CCK-8, excepto para dosis  $10^{-11}$  M, esto podría indicar que la IL-6 en estas células produce un aumento de la sensibilidad a CCK-8, al igual que describe Vigerie *et al.* (1994), puesto que mientras en AR42J-C el máximo se alcanza con  $10^{-9}$  M, en C+IL el máximo se alcanza con  $10^{-10}$  M.

En las células L+IL, al igual que en las C+IL, tampoco se observa la típica curva dosis respuesta, pero en el caso de células con membranas ricas en ácido linoleico parece que ocurre lo contrario, hay una disminución de la sensibilidad de las células a la CCK-8, el máximo de secreción se desplaza hacia dosis más altas de secretagogo.

Tanto en C+IL como en L+IL se pierde la típica curva dosis-respuesta, esto podría deberse a cambios en alguno de los mecanismos que intervienen en la secreción de esta enzima a dosis supramáxima de CCK-8, como son las alteraciones en las proteínas (Cosen-Binker *et al.*, 2007; Gaisano *et al.*, 2001) que intervienen en la fusión de gránulos y exocitosis o a cambios en el citoesqueleto (Lynch *et al.*, 2004; Beil *et al.*, 2002)

En las células O+IL frente a las no tratadas (AR42J-O), no se detectan cambios en la sensibilidad a CCK-8 en cuanto a la secreción de amilasa, puesto que el máximo de secreción sigue estando a una dosis de 1 nM, aunque como ya hemos indicado, los valores de secreción neta de amilasa en O+IL son siempre más bajos que AR42J-O.

Sí hemos encontrado una correlación positiva en los cambios que produce la IL-6 en el área bajo la curva de la  $[Ca^{2+}]_c$  y la sensibilidad a la estimulación por CCK-8 en función del perfil lipídico de membrana. En resumen, en células C+IL se produce un aumento del área bajo la curva (concentración citosólica de calcio) y un aumento en la sensibilidad a CCK-8 medida como secreción de amilasa respecto a células AR42J-C; en las células L+IL disminuye el área bajo la curva y disminuye la sensibilidad a CCK-8 para la secreción de amilasa respecto a AR42J-L. Y en células AR42J-O con membranas más monoinsaturadas, no hemos hallado cambios ni en el área bajo la curva ni en la secreción de amilasa al tratarlas con IL-6.

De forma global, podemos afirmar que diferencias el contenido en ácidos grasos del medio de cultivo de las células AR42J dan lugar a un comportamiento diferente en cuanto a la respuesta celular a la acción de IL-6. Futuras investigaciones deben ir encaminadas a elucidar qué ácidos grasos son beneficiosos o perjudiciales en células acinares pancreáticas frente a una combinación de varios mediadores inflamatorios.

## **5. Bibliografía**

Audi N, Mesa MD, Martínez MA, Martínez-Victoria E, Mañas M, Yago MD. Membrane Lipid Composition of Pancreatic AR42J Cells: Modification by Exposure to Different Fatty Acids. *Exp Biol Med* 232:532-541, 2007.

Beil M, Leser J, Lutz MP, Gukovskaya A, Seufferlein T, Lynch G, Pandol SJ, Adler G. Caspase 8-mediated cleavage of plectin precedes F-actin breakdown in acinar cells during pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G450-G460, 2002.

Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 202:145–156, 2004.

Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr Opin Investig Drugs* 2:496–501, 2001.

Bird GJ, Putney JW. Fluorescent indicators-fates and artifacts. In: Putney JW, Ed. *Calcium signalling*. Taylor & Francis Group. 2<sup>nd</sup> ed., 2006.

Bozem M, Kuhlmann S, Blum R, Feick P, Schulz I. Hormone-stimulated calcium release is inhibited by cytoskeleton-disrupting toxins in AR4-2J cells. *Cell Calcium* 28:73-82, 2000.

Bragado MJ, San Román JI, González A, García LJ, López MA, Calvo JJ. Impairment of intracellular calcium homeostasis in the exocrine pancreas after cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Clin Sci* 91:365-369, 1996.

Cosen-Binker LI, Lam PP, Binker MG, Reeve J, Pandol S, Gaisano HY. Alcohol/cholecystokinin-evoked pancreatic acinar basolateral exocytosis is mediated by protein kinase C alpha phosphorylation of Munc18c. *J Biol Chem* 282:13047-13058, 2007.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Centorrino T, Ciccolo A, McDonald MC, de Sarro A, Caputi AP, Thiemermann C. Absence of endogenous interleukin-6 enhances the inflammatory response during acute pancreatitis induced by cerulein in mice. *Cytokine* 18:274-285, 2002.

Dawson LJ, Christmas SE, Smith PM. An investigation of interactions between the immune system and stimulus-secretion coupling in mouse submandibular acinar cells. A possible mechanism to account for reduced salivary flow rates associated with the onset of Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 39:1226-1233, 2000.

Desai BN, Clapham DE. TRP channels and mice deficient in TRP channels. *Pflugers Arch* 451:11-18, 2005.

Díaz RJ. Influencia de la grasa de la dieta sobre el perfil lipídico de membranas y la función del páncreas exocrino. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2003.

Ferrand A, Kowalski-Chauvel A, Bertrand C, Escrieut C, Mathieu A, Portolan G, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M, Seva C. A novel mechanism for JAK2 activation

by a G protein-coupled receptor, the CCK2R: implication of this signaling pathway in pancreatic tumor models. *J Biol Chem.* 280:10710-5, 2005.

Gaisano HY, Lutz MP, Leser J, Sheu L, Lynch G, Tang L, Tamori Y, Trimble WS, Salapatek AM. Supramaximal cholecystokinin displaces Munc18c from the pancreatic acinar basal surface, redirecting apical exocytosis to the basal membrane. *J Clin Invest* 108:1597-1611, 2001.

Galloway SW, Kingsnorth AN. Reduction in circulating levels of CD4-positive lymphocytes in acute pancreatitis: relationship to endotoxin, interleukin 6 and disease severity. *Br J Surg* 81:312, 1994.

Gibney MJ, Hunter B. The effects of short- and long-term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 47:255-259, 1993.

Grimble RF, Tappia PS. Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. *Z Ernährungswiss* 37:S57-S65, 1998.

Hardie RC. TRP channels and lipids: From *Drosophila* to mammalian physiology. *J Physiol* 578:9-24, 2007.

Hsu S, Schmid A, Sternfeld L, Anderie I, Solis G, Hofer HW, Schulz I. Tyrosine phosphatase PTP1B modulates store-operated calcium influx. *Cell Signal* 15:1149-1156, 2003.

Husain SZ, Grant WM, Gorelick FS, Nathanson MH, Shah AU. Caerulein-induced intracellular pancreatic zymogen activation is dependent on calcineurin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1594-G1599, 2007.

Ju KD, Yu JH, Kim H, Kim KH. Role of mitogen-activated protein kinases, NF-kappaB, and AP-1 on cerulein-induced IL-8 expression in pancreatic acinar cells. *Ann N Y Acad Sci* 1090:368-374, 2006.

Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 17:669-673, 2001.

Kingsnorth AN, Galloway SW, Formela LJ. Randomized, double-blind phase II trial of Lexipafant, a platelet-activating factor antagonist, in human acute pancreatitis. *Br J Surg* 82:1414-1420, 1995.

Lai JK, Cheng CH, Ko WH, Leung PS. Ghrelin system in pancreatic AR42J cells: Its ligand stimulation evokes calcium signalling through ghrelin receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 37:887-900, 2005.

Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M, Ruckauer K, Andreesen R, Farthman EH, Scholmerich J. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 101:782-785, 1991.

Liu L, Zhu W, Zhang ZS, Yang T, Grant A, Oxford G, Simon SA. *J Neurophysiol* 91:1482-1491, 2004.

Liu XB, Sun X, Mörk AC, Dodds MW, Martinez JR, Zhang GH. Characterization of the calcium signaling system in the submandibular cell line SMG-C6. *Proc Soc Exp Biol Med* 225:211-220, 2000.

Lynch G, Kohler S, Leser J, Beil M, Garcia-Marin LJ, Lutz MP. The tyrosine kinase Yes regulates actin structure and secretion during pancreatic acinar cell damage in rats. *Pflugers Arch* 447:445-451, 2004.

Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9:401-410, 2002.

Mantizioris E, James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Differences exist in the relationships between dietary linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids and their respective long-chain metabolites. *Am J Clin Nutr* 61:320-324, 1995.

Martínez MA, Lajas AI, Yago MD, Redondo PC, Granados MP, González A, Rosado JA, Martínez-Victoria E, Mañas M, Pariente JA. Dietary virgin olive oil enhances secretagogue-evoked calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Nutrition* 20:536-541, 2004.

Martinez-Victoria E, Diaz R, Yago MD, Martinez MA, Vilchez JR, Singh J, Mañas M. Modulation of amylase release and intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization by dietary fat in isolated rat pancreatic acinar cells *J Physiol*. 548P: 1P, 2003.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4196-4200, 1997.

Niederau C, Niederau M, Lüthen R, Strohmeyer G, Ferrell LD, Grendell JH. Pancreatic exocrine secretion in acute experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 99:1120-1127, 1990.

Nilius B, Mahieu F, Karashima Y, Voets T. Regulation of TRP channels: A voltage-lipid connection. *Biochem Soc Trans* 35:105-108, 2007.

Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton C, Faulkner J, Gower WR, Franz MG. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. *Dig Dis Sci* 42:1783-1788, 1997.

Okada N, Ohshio G, Tanaka T, Wang ZH, Doi R, Imamura M. Intracellular  $Ca^{2+}$  response of pancreatic acini in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Hepato-gastroenterology* 45:840-845, 1998.

Pandol SJ, Schoeffeld MS, Sachs G, Muallem S. Role of free cytosolic calcium in secretagogue-stimulated amylase release from dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 260:10081-10086, 1985.



Rosado JA, González A, Salido GM, Pariente JA. Effects of reactive oxygen species on actin filament polymerisation and amylase secretion in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* 14:547-556, 2002.

Shimada M, Andoh A, Hata K, Tasaki K, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T. IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators. *J Immunol* 168:861-868, 2002.

Shimizu H, Ohtani K, Kato Y, Mori M. Interleukin-6 increases insulin secretion and preproinsulin mRNA expression via Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism. *J Endocrinol* 166:121-26, 2000.

Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology* 116:420-430, 1999.

Tietz AB, Malo A, Diebold J, Kotlyarov A, Herbst A, Kolligs FT, Brandt-Nedelev B, Halangk W, Gaestel M, Göke B, Schäfer C. Gene deletion of MK2 inhibits TNF-alpha and IL-6 and protects against cerulein-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G1298-G1306, 2006.

Trevisani M, Smart D, Gunthorpe MJ, Tognetto M, Barbieri M, Campi B, Amadesi S, Gray J, Jerman JC, Brough SJ, Owen D, Smith GD, Randall AD, Harrison S, Bianchi A, Davis JB, Geppetti P. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci* 5:546-551, 2002.

Viedma JA, Perez-Mateo M, Dominguez JE, Carballo F. Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A. *Gut* 33:1264-1267, 1992.

Viguerie N, Bertrand V, Dufresne M, Davis E, Lefort S, Vita N, Vaysse N, Pradayrol L, Bastie MJ. Interleukin-6 regulation of CCK/gastrin receptors and amylase secretion in a rat pancreatic acinar cell line (AR4-2J). *Eur. Cytokine Netw* 5:433-440, 1994.

Weigert C, Düfer M, Simon P, Debre E, Runge H, Brodbeck K, Häring HU, Schleicher ED. Upregulation of IL-6 mRNA by IL-6 in skeletal muscle cells: role of IL-6 mRNA stabilization and Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1139-C1147, 2007.

Williams JA, Blevins GT. Cholecystokinin and regulation of pancreatic acinar cell function. *Physiol Rev* 73:701-723, 1993.

Yago MD, Díaz RJ, Martínez MA, Audi N, Naranjo JA, Martínez-Victoria E, Mañas M. Effects of the type of dietary fat on acetylcholine-evoked amylase secretion and calcium mobilization in isolated rat pancreatic acinar cells. *J Nutr Biochem* 17:242-249, 2006.

Yago MD, Diaz RJ, Ramirez R, Martinez MA, Mañas M, Martinez-Victoria E. Dietary-induced changes in the fatty acid profile of rat pancreatic membranes are associated with modifications in acinar cell function and signalling. *Br J Nutr* 91:227-234, 2004.

Yao X, Garland CJ. Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circ Res* 97:853-863, 2005.

Yu JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. NADPH oxidase mediates interleukin-6 expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1458-1469, 2005.

Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. *Lab Invest* 82:1359-1368, 2002.

Zhang N, Inan S, Cowan A, Sun R, Wang JM, Rogers TJ, Caterina M, Oppenheim JJ. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proc Natl Acad Sci* 102:4536-4541, 2005.

Zhou J, Montrose-Rafizadeh C, Janczewski AM, Pineyro MA, Sollott SJ, Wang Y, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 does not mediate amylase release from AR42J cells. *J Cell Physiol* 181:470-478, 1999.



**Mechanisms involved with the early stages of acinar cell injury induced by bile acids in AR42J pancreatic acinar cells. Modulation by changes in membrane fatty acids.**

**AUDI N, LÓPEZ-MILLÁN MB, SANTANA C, MARTÍNEZ-BURGOS MA, MAÑAS M, MARTÍNEZ-VICTORIA E, YAGO MD.**

*Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology, University of Granada, C/ Ramón y Cajal 4, 18071 Granada, Spain*

## **1. Introduction**

Acute pancreatitis is a reversible inflammatory process of the pancreas. Although the disease process may be limited to pancreatic tissue, it also can involve peripancreatic tissues or more distant organ sites. Acute pancreatitis may occur as an isolated attack or may be recurrent. It has a variety of causes and can range in severity from mild to severe and life threatening. Some patients may require brief hospitalization, whereas others may be critically ill with multiple organ dysfunction requiring intensive care monitoring (Carroll *et al.*, 2007). At present acute pancreatitis lacks any specific therapy. Gallstone obstruction, usually microlithiasis, is the most common cause (30%-50%) of acute pancreatitis in the clinical setting (Toouli *et al.*, 2002). Gallstones can cause acute pancreatitis probably because of biliary reflux into the pancreatic duct and subsequent bile acid action on the acinar cells (Gerasimenko *et al.*, 2006).

The acinar cell is the primary target of injury from alcohol metabolites, bile, hyperlipidaemia, hyperstimulation and other causes. These induce abnormal, prolonged, global, cytosolic calcium signals, the prevention of which also prevents premature digestive enzyme activation, cytokine expression, vacuole formation and acinar cell necrosis. Such agents increase calcium entry through the plasma membrane and/or increase calcium release from intracellular stores, shown to result from effects on calcium channels and calcium pumps, or their energy supply. A multitude of signalling mechanisms are activated, diverted or disrupted, including secretory mechanisms, lysosomal regulators, inflammatory mediators, cell survival and cell death pathways, together with or separately from calcium. While recent discoveries have increased insight and suggest prophylaxis or treatment targets, more work is required to define the mechanisms and interactions of cell signalling pathways in the pathogenesis of pancreatitis (Criddle *et al.*, 2007).

Müller *et al.* (2007) demonstrated that wounding of acinar cell plasma membranes occurs at the onset of acute pancreatitis. Disruption of the membranes could be expected to allow the influx of calcium ions, causing massive intracellular alterations, and exit of molecules, such as enzymes from acinar cells.

The relationship between dietary lipids and inflammatory diseases has been widely studied in inflammatory bowel disease (Wild *et al.*, 2007; Razack & Seidner, 2007; Roy *et al.*, 2007; Andoh *et al.*, 2003), atherosclerosis (Haidar & Soeatmadji, 2007; Matsumoto *et al.*, 2008; Bell *et al.*, 2007) and rheumatoid arthritis (Rahman *et al.*, 2008; Butz *et al.*, 2007; Leeb *et al.*, 2006). But there are few studies about the effects of dietary fatty acids on acute pancreatitis. Among them, we found studies that mainly evaluate the systemic inflammatory response or study markers of oxidation in rats (Alhan *et al.*, 2006; Kilian *et al.*, 2006; Foitzik *et al.*, 2002) or humans (Lasztity *et al.*, 2005) with pancreatitis that they are supplemented with different fatty acids. We only found one study (Sharif *et al.*, 2006) that describes the effects of pre-treatment with different fatty acids before the induction of pancreatitis.

We intend to investigate the evolution of cellular mechanisms during the first stages of bile acids-induced acute pancreatitis in pancreatic acinar cells varying in membrane fatty acid composition. Previous work undertaken by our group has shown that modification of membrane fatty acids confers different protection against oxidative stress, also resulting in functional changes at the level of the stimulus-secretion coupling process (Martínez-Victoria *et al.*, 2003). Particularly, we have observed a clear influence on the response of pancreatic acinar cells to classic pancreatic secretagogues such as CCK, leading to differential elevation of cytosolic calcium levels and, consequently, to differential biological responses (Yago *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2004).

The results of this study would allow us to know whether these modified cell membranes are more or less resistant to the injurious etiologic agent bile acids, and go further in the study of the pathogenesis of this disease. So we have used the rat pancreatoma cell line AR42J to assess the functionality of these cells exposed to bile acids alone or in combination with different doses of CCK-8; and assess the effects of different fatty acids added to the culture medium on the functionality of these cells. We also studied the effects on the disruption of the plasma membranes by determination of lactate dehydrogenase (LDH) released to the medium.

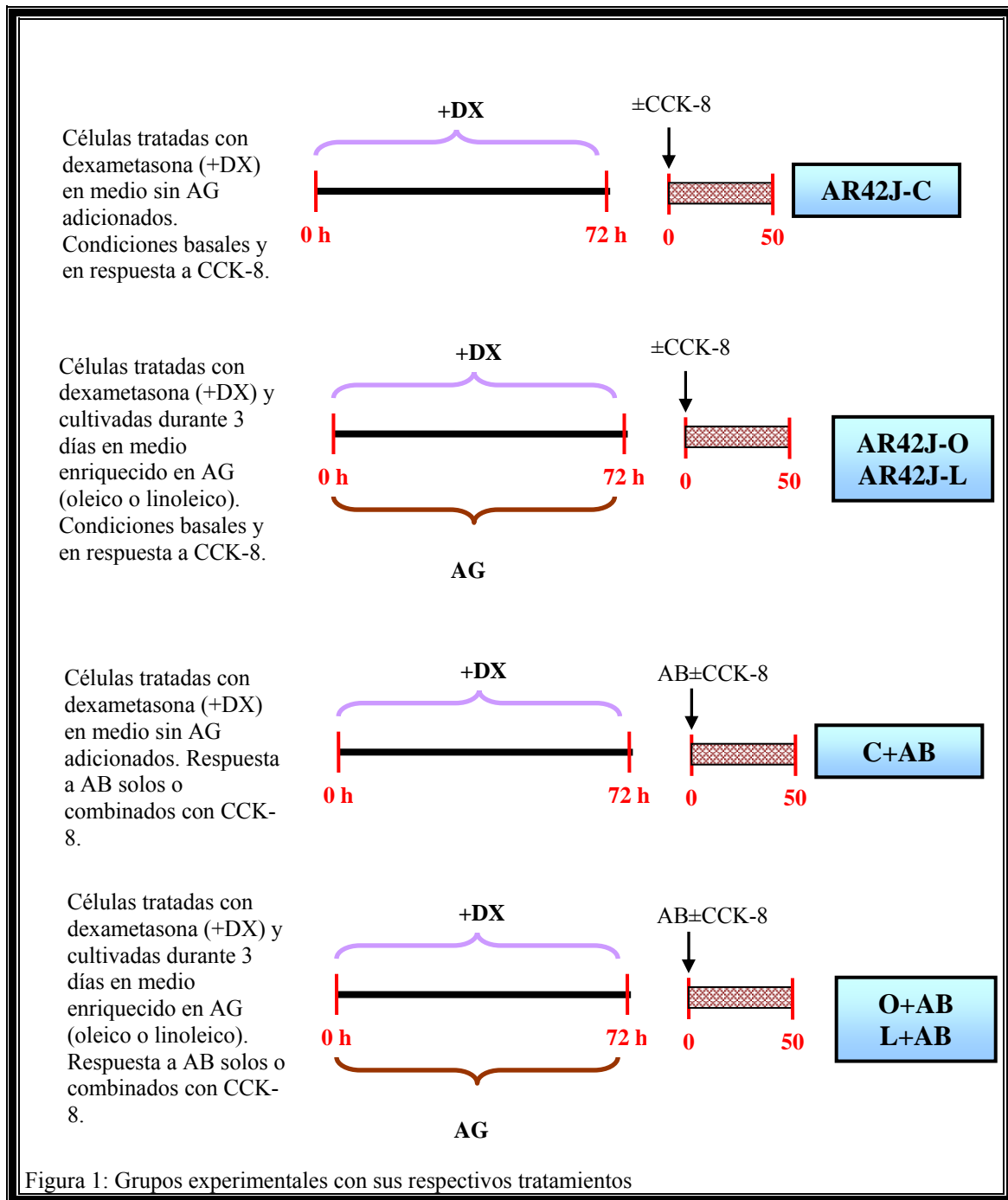
## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Cultivo Celular**

Las células AR42J se cultivaron en las condiciones que se especifican en el apartado general de Materiales y Métodos (ver página 29). Las células AR42J fueron sometidas a los siguientes tratamientos de forma individual o combinados:

- a) Tratamiento de 72 h con 100 nM de dexametasona (DX) adicionada al medio de cultivo para inducir la diferenciación hacia el fenotipo exocrino (Bozem *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2003).
  
- b) Se indujeron modificaciones en los ácidos grasos (AG) de las membranas de las células AR42J durante las 72 h del periodo de diferenciación, de acuerdo con lo descrito previamente (Audi *et al.*, 2007). El medio de cultivo se enriqueció en 18:1 n-9 o 18:2 n-6 para obtener las células del grupo AR42J-O y AR42J-L, respectivamente. La concentración final en el medio de cultivo de los AG adicionados fue de 50  $\mu$ M. Las células control (AR42J-C) se cultivaron en un medio de cultivo que contenía un suero fetal bovino sin ácidos grasos adicionados.

En la figura 1 se muestra un esquema de los distintos tratamientos a los que se sometieron las células, así como la posterior incubación de 50 min con distintas sustancias.





## **2.2 Liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH)**

La incubación de las células y posterior determinación de la actividad de LDH en el medio de incubación se realizó según se detalla en el apartado general de Materiales y Métodos (página 29).

Se ensayó la actividad de LDH en el medio de cultivo en células con distinto perfil en ácidos grasos de membrana (AR42J-C, AR42J-O, AR42J-L) tanto a nivel basal como tras estimular las células con distintas concentraciones ( $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M) del octapéptido de colecistoquinina (CCK-8).

En células AR42J-C se determinó la liberación de LDH al medio de cultivo tras 50 min en ausencia (control) o presencia de concentraciones crecientes de ácido biliar (AB) tauroquenodeoxicolato sódico (TCDC-Na) (0.1, 0.2, 1, 2 y 5 mM).

También se midió la actividad de LDH en el medio de células con distinto perfil de membranas incubadas durante 50 min a 37 °C en presencia de AB solos o combinados con distintas concentraciones de CCK-8. Siendo en este caso los grupos obtenidos los que hemos llamado: C+AB, O+AB, L+AB.

## **2.3 Secreción de Amilasa**

Se examinó el efecto de 1 mM de TCDC-Na, tanto sola como combinada con distintas concentraciones de CCK-8 ( $10^{-11}$  M -  $10^{-7}$  M) sobre la secreción de amilasa. La incubación de las células con las sustancias a ensayar y el posterior análisis de la actividad amilásica basal (% total) y la secreción neta de amilasa (% total) se realizaron de acuerdo con el apartado general de Materiales y Métodos (ver página 29).

## **2.4 Análisis Estadístico**

A no ser que se indique lo contrario, los resultados en el texto y gráficas se expresan como media  $\pm$  E.E.M. Para las variables con una distribución normal, se aplicó el test de Levene de homogeneidad de varianzas, examinándose posteriormente las diferencias entre los diferentes grupos mediante un ANOVA de una vía (Procedimiento

one-way de SPSS), utilizando como test a posteriori (*post hoc*) el de la Diferencia Menos Significativa (Least Significant Difference, LSD), y el de Tukey's HSD (honestly significant difference) cuando la variable independiente tenía más de 2 categorías, o mediante el test de a t de Student para variables independientes de dos categorías.

Se consideraron significativas aquellas diferencias con valores de  $p < 0.05$ . Para el análisis estadístico se utilizó la aplicación informática SPSS para Windows.

### 3. Resultados

#### 3.1 Liberación de LDH

La modificación del perfil de ácidos grasos de la membrana de las células AR42J no produce ninguna alteración en su integridad en situación basal, no estimuladas, ya que la liberación de LDH en estas condiciones es similar, independientemente de la composición de la membrana (grupos AR42J-C, AR42J-O, AR42J-L) (figura 3).

Cuando estas mismas células se estimularon con distintas dosis de CCK-8, encontramos diferencias significativas en AR42J-C respecto a valores en situación basal, respecto a la dosis 1 nM de CCK-8. En las células AR42J-O, las dosis de CCK-8 de  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M y  $10^{-7}$  M produjeron mayor liberación de LDH que cuando no se trataban las células con este secretagogo. En el grupo AR42J-L obtuvimos el mismo nivel de liberación de LDH tanto si se estimulaban las células con diferentes dosis de CCK-8 como si no. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la liberación de LDH entre células AR42J-C, AR42J-O y AR42J-L estimuladas con CCK-8 (figura 3).

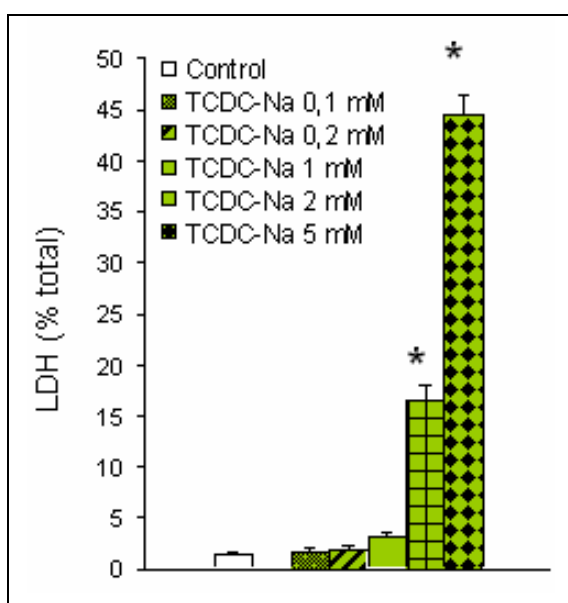


Figura 2: Liberación de LDH inducida por diferentes concentraciones de TCDC-Na (AB) en células AR42J-C. \*  $p < 0.05$  vs. control.

Para estudiar los efectos de los ácidos biliares (AB) sobre las células AR42J hicimos un estudio sometiendo a estas células a diferentes dosis de TCDC-Na. Los

resultados, que se muestran en la figura 2, revelan en células AR42J-C una lisis evidente con 2 y 5 mM de AB, mientras que dosis de 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M y 1 mM no causaron un efecto significativo sobre la integridad de membrana.

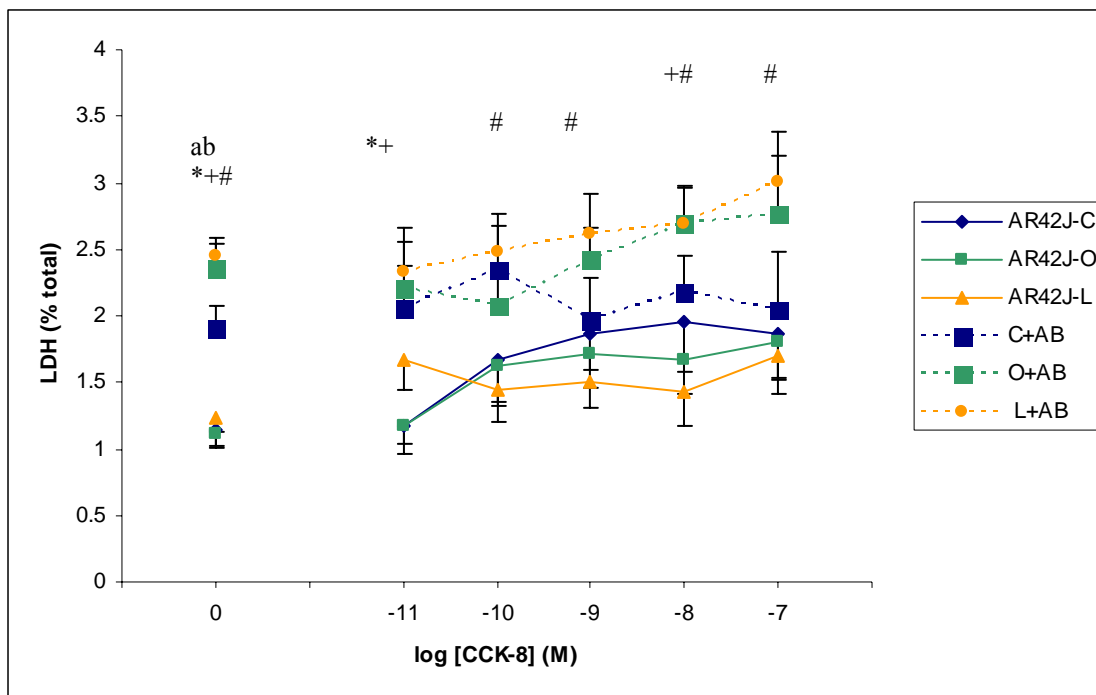


Figura 3: Actividad de LDH en el medio de incubación expresada como porcentaje de la actividad LDH total de las células. Se midió la actividad LDH en células con diferente perfil de AG de membrana tanto en tanto situación basal como en respuesta a distintas concentraciones de CCK-8, a 1 mM de AB, y a ambas sustancias conjuntamente. Significaciones estadísticas:

\*:  $p < 0.05$  AR42J-C vs. C+AB

a:  $p < 0.05$  C+AB vs. O+AB

+:  $p < 0.05$  AR42J-O vs. O+AB

b:  $p < 0.05$  C+AB vs. L+AB

#:  $p < 0.05$  AR42J-L vs. L+AB

En base a estos resultados hemos seleccionado la dosis de 1 mM de TCDC-Na para los estudios posteriores. Así hemos observado en células con distinto perfil lipídico de membrana tratadas con AB que en ausencia de estímulos (basal) las células O+AB y L+AB liberan mayor cantidad de LDH que las células C+AB (figura 3).

Cuando se trataron con CCK-8 junto con AB no encontramos diferencias significativas a ninguna dosis de CCK-8 respecto al nivel basal de liberación de LDH, tampoco encontramos diferencias entre los tres grupos (C+AB, O+AB y L+AB).

Al comparar células sometidas o no a la acción de AB encontramos que las células C+AB, O+AB y L+AB tienen una liberación basal de LDH significativamente mayor que las células sin tratar con TCDC-Na (AR42J-C, AR42J-O y AR42J-L,

respectivamente). El tratamiento conjunto con CCK-8 y AB produjo las mayores diferencias en la liberación de la enzima, entre células L+AB y AR42J-L.

### **3.2 Secreción de Amilasa en Células Sometidas o No a la Acción de AB**

**AR42J-C vs. C+AB.** Las células control incubadas con AB de forma simultánea a la estimulación con CCK-8 presentan una secreción basal de amilasa mayor que las células incubadas en ausencia de AB. La secreción neta de amilasa cuando se estimula con altas dosis de CCK-8 ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M) es mayor en células incubadas con AB.

**AR42J-O vs. O+AB.** En el caso de células con membranas ricas en ácido oleico la secreción basal es mayor en células incubadas en presencia de AB (O+AB). En lo que respecta a la secreción neta no hay diferencias significativas entre los dos grupos.

**AR42J-L vs. L+AB.** En el caso de células con membranas enriquecidas en ácido linoleico no hay diferencias en la secreción basal de amilasa cuando las células están en presencia (L+AB) y o no (AR42J-L) de AB. En el caso de la secreción neta estimulada sólo hay diferencias a dosis de  $10^{-10}$  M de CCK-8.

### **3.3 Secreción de Amilasa en Células con Distinto Perfil de Membranas Sometidas a la Acción de AB**

**C+AB vs. O+AB vs. L+AB.** No existen diferencias significativas ni en la secreción neta de amilasa entre células O+AB vs. C+AB ni entre O+AB vs. L+AB.

En el caso de C+AB y L+AB sólo hay diferencias en la secreción total y en la neta cuando se estimulan con una dosis de  $10^{-10}$  M de CCK-8.

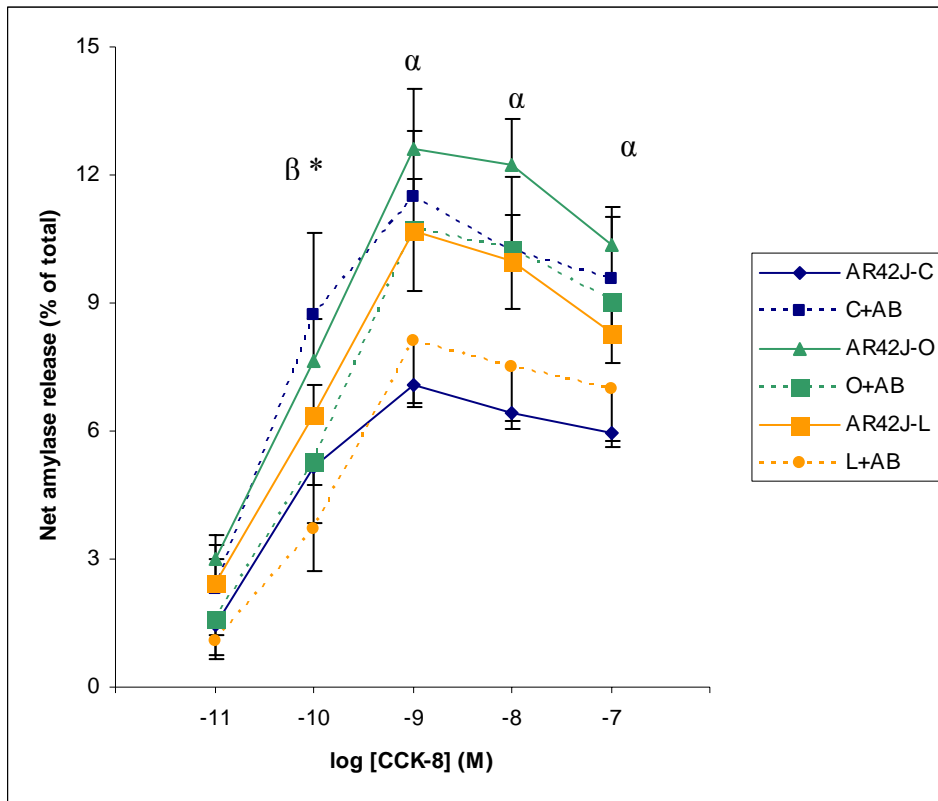


Figura 4: La secreción neta de amilasa (incremento sobre la secreción basal) en células AR42J diferenciadas está expresada como porcentaje del contenido inicial total. Se midió la actividad amilásica en células con diferente perfil de AG de membrana tanto en tanto situación basal como en respuesta a distintas concentraciones de CCK-8, a 1 mM de AB, y a ambas sustancias conjuntamente. Significaciones estadísticas ( $p < 0.05$ ):  $\alpha$ : C+DX vs. C+AB;  $\beta$ : L+DX vs. L+AB; \* C+AB vs. L+AB.

#### **4. Discusión**

Aunque la bilis se ha asociado con pancreatitis, el mecanismo por el que los ácidos biliares producen el daño celular no es conocido. Los ácidos biliares tienen propiedades detergentes, y normalmente se asume que el reflujo de bilis puede destruir las células acinares por lisis. Teniendo en cuenta la anatomía del árbol biliar, es poco probable que altas dosis de ácidos biliares puedan alcanzar las células acinares pancreáticas (Moody *et al.* 1993; Gorelick, 1995). Por ello, podemos pensar que los ácidos biliares que alcanzan el páncreas no actúen dañando a las células por lisis (debido a su poder detergente) sino que interfieran con procesos celulares fundamentales para provocar el daño (procesos tales como los movimientos intracelulares de calcio).

Por ello, en este trabajo nuestro primer objetivo fue seleccionar una dosis de AB que no lisara las células por su efecto detergente. Tras un estudio preeliminar de los efectos sobre la integridad de la membrana de diferentes dosis de TCDC-Na, nuestros resultados (figura 2) revelan una lisis evidente con 2 y 5 mM de TCDC-Na, mientras que dosis de 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M y 1 mM no causaron un efecto significativo sobre la integridad de membrana. Para los estudios posteriores, hemos seleccionado la dosis de 1 mM de sal biliar, ya que a la vista de los resultados que acabamos de comentar esta dosis representa una aproximación realista a las dosis de sales biliares que probablemente llegan al páncreas en las pancreatitis obstructivas. Las dosis empleadas no son aquellas que producen un efecto detergente devastador, sino dosis bajas que han demostrado producir daño celular a través de mecanismos más sutiles (Kim *et al.* 2002; Voronina *et al.* 2002; Voronina *et al.* 2004).

Los valores de LDH en células AR42J con distinto perfil lipídico de membrana fueron similares tanto en condiciones basales como en respuesta a distintas dosis de CCK-8. Por tanto, la modificación de la composición lipídica de la membrana no parece afectar a la viabilidad celular.

Por otro lado, la liberación de LDH en células AR42J, con distinta composición en ácidos grasos de membrana, sometidas a la acción de AB solos o junto a distintas dosis de CCK-8, también es similar entre los tres grupos (C+AB, O+AB y L+AB).

Aunque en este caso sí encontramos diferencias entre C+AB frente a los otros dos grupos cuando no se estimulan con CCK-8.

Por tanto, podemos afirmar que el efecto de los AB (1 mM) sobre la integridad de la membrana celular es prácticamente independiente del perfil lipídico de ésta, sobre todo cuando va unido a la acción de CCK-8.

Hemos comprobado que independientemente del perfil en ácidos grasos de las membranas celulares, los ácidos biliares producen un daño en la integridad de las membranas con respecto a células no expuestas a ellos. Cuando además de someter a las células a AB se estimulan simultáneamente con distintas dosis de CCK-8, este daño se aprecia sobre todo en células con membranas enriquecidas en ácido linoleico respecto a AR42J-L sin tratar con AB.

La tasa de LDH liberada es similar tanto si se somete a las células a AB sólo como si se combina con cualquier dosis de CCK-8. Esto indica que la CCK-8 no potencia el daño producido por los AB sobre las células con distinto perfil lipídico.

En cualquier caso, la liberación de LDH al exponer a las células a 1 mM de AB no alcanza el 5%. Por tanto, los efectos observados sobre la secreción de amilasa en células con distinto perfil de membranas sometidas a la acción de AB no parece deberse a un efecto detergente de los AB, sino más bien a mecanismos moleculares más sutiles.

Los ácidos biliares (AB), al igual que el resto de agentes etiológicos de pancreatitis, producen un aumento en la concentración de amilasa sérica. A nivel celular, hemos observado que en células AR42J los AB producen un aumento significativo en el nivel de secreción basal de amilasa. Estas diferencias en la secreción basal de células expuestas o no a la acción de AB la hemos encontrado en células con membranas sin modificar y en células con membranas más monoinsaturadas, sin embargo no hemos encontrado diferencias en las células con membranas más poliinsaturadas, aunque las células AR42J-L ya tenían de por sí un nivel de secreción basal alto antes de añadir AB.



Cuando comparamos la secreción de amilasa en células del grupo control (C+AB) tratadas con AB+CCK-8 con ese mismo grupo tratado sólo con CCK-8 (AR42J-C), se produce una secreción mayor en el primer grupo. Esto confirma lo dicho anteriormente, es decir, que los efectos observados se deben a AB y no a la CCK-8, posiblemente a través de mecanismos moleculares; aunque no descartamos que los AB puedan interferir en los efectos de la CCK-8 sobre los movimientos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En células O+AB y L+AB estimuladas con diferentes dosis de CCK-8 no encontramos diferencias significativas en la secreción de amilasa respecto a células con estas mismas membranas pero sin estar sometidas a AB. Siendo la tendencia opuesta a la observada en C+AB, ya que la secreción de amilasa en O+AB y L+AB están ligeramente por debajo de AR42J-O y AR42J-L, respectivamente; al contrario de lo que ocurre en células C+AB respecto a AR42J-C.

Estudios recientes han demostrado que los efectos de los ácidos biliares se deben a su captación por transportadores de ácidos biliares localizados en el polo apical de la célula, seguida tanto de liberación de calcio del retículo endoplasmático a través de los efectos sobre los receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) como de prevención de la recaptación en los almacenes por inhibición de la bomba de captación de calcio del retículo endoplasmático (Fischer *et al.*, 2006; Voronina *et al.*, 2002). Esto da lugar a un gran incremento en el calcio citoplasmático que conduce a una captación mitocondrial y consecuente disfunción, seguida de muerte celular por necrosis. Los cambios en el calcio pueden también causar inflamación por activación del factor NF- $\kappa$ B (Vaquero *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002).

Se ha visto que la actividad de captación dependiente de  $\text{Na}^+$  está predominantemente mediada por la función de polipéptido *Na<sup>+</sup>-dependent taurocholic cotransporting polypeptide* (NTCP). (Kullak-Ublick *et al.*, 2004; Meier & Stieger, 2002; Trauner & Boyer, 2003). NTCP se expresa en el hígado y su polipéptido está localizado exclusivamente en la membrana basolateral de los hepatocitos (Hagenbuch & Dawson, 2004; Geyer *et al.*, 2006; Ananthanarayanan *et al.*, 1994). Recientemente, se ha detectado en rata la expresión de Ntcp en la membrana luminal de células acinares pancreáticas donde puede estar implicada en el aclaramiento de ácidos biliares que se

filtran hacia los acinos pancreáticos terminales (Geyer *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2002). La captación de ácidos biliares mediada por NTCP en células pancreáticas está asociada con daño celular (Kim *et al.*, 2002).

Estudios previos han demostrado también un rápido incremento en el transporte de ácidos biliares dependiente de  $\text{Na}^+$  por cAMP vía tráfico vesicular de NTCP desde el *pool* intracelular hacia la membrana basolateral (Anwer, 2004). Esta forma de regulación converge en una vía de señalización que es dependiente del citoesqueleto de actina,  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, PI3K, PKC $\zeta$  y protein fosfatasa B2 (Anwer, 2004). Recientemente, Anwer *et al.* presentaron una importante evidencia experimental que sugiere que cAMP puede incrementar la tranlocación de NTCP por la defosforilación del residuo de serina-226 del polipéptido NTCP (Anwer *et al.*, 2005). Esta defosforilación parece retener el polipéptido NTCP en la membrana plasmática incrementando su expresión en superficie y estimulando su actividad (Anwer *et al.*, 2005).

Por tanto, es posible que las diferencias que encontramos en células con distinto perfil lipídico de membrana den lugar a cambios en la expresión del transportador NTCP, lo cual podría producir una mayor entrada de AB en las células y provocar trastornos en los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  que darían lugar a inflamación, y diferente secreción de amilasa en función de la composición lipídica de la membrana. No descartamos la posibilidad de medir el nivel de AB que se alcanza dentro de las células para comprobar si las diferencias se deben a modificaciones en la acción del transportador de membrana.

## **5. Bibliografía**

Alhan E, Türkyilmaz S, Erçin C, Kaklıkkaya N, Kural BV. Effects of omega-3 fatty acids on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Eur Surg Res* 38:314-321, 2006.

Ananthanarayanan M, Ng OC, Boyer JL, Suchy FJ. Characterization of cloned rat liver Na(+)-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *Am J Physiol* 267:G637-G643, 1994.

Andoh A, Tsujikawa T, Ishizuka I, Araki Y, Sasaki M, Koyama S, Fujiyama Y. N-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis. *Int J Mol Med* 12:721-725, 2003.

Anwer MS, Gillin H, Mukhopadhyay S, Balasubramaniyan N, Suchy FJ, Ananthanarayanan M. Dephosphorylation of Ser-226 facilitates plasma membrane retention of Ntcp. *J Biol Chem* 280:33687-33692, 2005.

Anwer MS. Cellular regulation of hepatic bile acid transport in health and cholestasis. *Hepatology* 39:581-590, 2004.

Audi N, Mesa MD, Martínez MA, Martínez-Victoria E, Mañas M, Yago MD. Membrane Lipid Composition of Pancreatic AR42J Cells: Modification by Exposure to Different Fatty Acids. *Exp Biol Med* 232:532-541, 2007.

Bell TA 3rd, Kelley K, Wilson MD, Sawyer JK, Rudel LL. Dietary fat-induced alterations in atherosclerosis are abolished by ACAT2-deficiency in ApoB100 only, LDLr<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1228-1230, 2007.

Bozem M, Kuhlmann S, Blum R, Feick P, Schulz I. Hormone-stimulated calcium release is inhibited by cytoskeleton-disrupting toxins in AR4-2J cells. *Cell Calcium* 28:73-82, 2000.

Butz DE, Li G, Huebner SM, Cook ME. A mechanistic approach to understanding conjugated linoleic acid's role in inflammation using murine models of rheumatoid arthritis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R669-R676, 2007.

Carroll JK, Herrick B, Gipson T, Lee SP. Acute pancreatitis: diagnosis, prognosis, and treatment. *Am Fam Physician* 75:1513-1520, 2007.

Criddle DN, McLaughlin E, Murphy JA, Petersen OH, Sutton R. The pancreas misled: Signals to pancreatitis. *Pancreatology* 7:436-446, 2007.

Fischer L, Gukovskaya AS, Penninger JM, Mareninova OM, Friess H, Gukovsky I, Pandol SJ. Phosphatidylinositol 3-kinase facilitates bile acid-induced Ca<sup>2+</sup> responses in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G875-G886, 2007.

Foitzik T, Eibl G, Schneider P, Wenger FA, Jacobi CA, Buhr HJ. Omega-3 fatty acid supplementation increases anti-inflammatory cytokines and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 26:351-356, 2002.

Gerasimenko JV, Flowerdew SE, Voronina SG, Sukhomlin TK, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV. Bile acids induce Ca<sup>2+</sup> release from both the endoplasmic reticulum and acidic intracellular calcium stores through activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors. *J Biol Chem* 281:40154-40163, 2006.

Geyer J, Wilke T, Petzinger E. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 372:413-431, 2006.

Gorelick FS. Acute pancreatitis. In: Yamada T, ed. *Textbook of gastroenterology*. Philadelphia: Lippincott 2064-2091, 1995.

Hagenbuch B, Dawson P. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch* 447:566-570, 2004.

Haidar, Soeatmadji DW. Effects of high-carbohydrate and high fat diet on formation of foam cells and expression of TNF-alpha in *Rattus novergicus*. *Acta Med Indones* 39:119-123, 2007.

Hsu S, Schmid A, Sternfeld L, Anderie I, Solis G, Hofer HW, Schulz I. Tyrosine phosphatase PTP1B modulates store-operated calcium influx. *Cell Signal* 15:1149-1156, 2003.

Kilian M, Heukamp I, Gregor JI, Bretthauer C, Walz MK, Jacobi CA, Lochs H, Schimke I, Guski H, Wenger FA. n-3, n-6, and n-9 polyunsaturated fatty acids--which composition in parenteral nutrition decreases severity of acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats?. *Int J Colorectal Dis* 21:57-63, 2006.

Kim JY, Kim KH, Lee JA, Namkung W, Sun AQ, Ananthanarayanan M, Suchy FJ, Shin DM, Muallem S, Lee MG. Transported-mediated bile-acid uptake causes Ca<sup>2+</sup> - dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 122:1941-1953, 2002.

Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 126:322-342, 2004.

Lasztity N, Hamvas J, Biró L, Németh E, Marosvölgyi T, Decsi T, Pap A, Antal M. Effect of enterally administered n-3 polyunsaturated fatty acids in acute pancreatitis-a prospective randomized clinical trial. *Clin Nutr* 24:198-205, 2005.

Leeb BF, Sautner J, Andel I, Rintelen B. Intravenous application of omega-3 fatty acids in patients with active rheumatoid arthritis. The ORA-1 trial. An open pilot study. *Lipids* 41:29-34, 2006.

Martínez MA, Lajas AI, Yago MD, Redondo PC, Granados MP, González A, Rosado JA, Martínez-Victoria E, Mañas M, Pariante JA. *Nutrition* 20:536-541, 2004.

Martínez-Victoria E, Díaz RJ, Yago MD, Martínez MA, Vilchez JR, Singh J, Mañas M. *Journal of Physiology* 548P: P183, 2003.

Matsumoto M, Sata M, Fukuda D, Tanaka K, Soma M, Hirata Y, Nagai R. Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 197:524-533, 2008.

Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64:635-661, 2002.

Moody FG, Senninger N, Runkel N. Another challenge to the Opie myth. *Gastroenterology* 104:927-931, 1993.

Müller MW, McNeil PL, Büchler P, Ceyhan GO, Wolf-Hieber E, Adler G, Beger HG, Büchler MW, Friess H. Acinar cell membrane disruption is an early event in experimental acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 35:e30-e40, 2007.

Rahman MM, Bhattacharya A, Fernandes G. Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells than eicosapentaenoic acid. *J Cell Physiol* 214:201-209, 2008.

Razack R, Seidner DL. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 23:400-405, 2007.

Roy N, Barnett M, Knoch B, Dommels Y, McNabb W. Nutrigenomics applied to an animal model of Inflammatory Bowel Diseases: transcriptomic analysis of the effects of eicosapentaenoic acid- and arachidonic acid-enriched diets. *Mutat Res* 622:103-116, 2007.

Sharif S, Broman M, Babcock T, Ong E, Jho D, Rudnicki M, Helton WS, Espat NJ. A priori dietary omega-3 lipid supplementation results in local pancreatic macrophage and pulmonary inflammatory response attenuation in a model of experimental acute edematous pancreatitis (AEP). *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 30:271-276, 2006.

Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R. Working Party of the Program Committee of the Bangkok World Congress of Gastroenterology 2002. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 17:S15-S39, 2002.

Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633-671, 2003.

Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1197-G1208, 2001.

Voronina S, Longbottom R, Sutton R, Petersen OH, Tepikin A. Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells: implications for bile-induced pancreatic pathology. *J Physiol* 540:49-55, 2002.

Voronina SG, Barrow SL, Gerasimenko OV, Petersen OH, Tepikin AV. Effects of secretagogues and bile acids on mitochondrial membrane potential of pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 279:27327-27338, 2004.

Wild GE, Drozdowski L, Tartaglia C, Clandinin MT, Thomson AB. Nutritional modulation of the inflammatory response in inflammatory bowel disease--from the molecular to the integrative to the clinical. *World J Gastroenterol* 13:1-7, 2007.

Yago MA, Díaz RJ, Ramirez R, Martinez MA, Mañas M, Martinez-Victoria E. Dietary-induced changes in the fatty acid profile of rat pancreatic membranes are associated with modifications in acinar cell function and signalling. *British Journal of Nutrition* 91:227-234, 2004.









## **SUMMARY**

Dietary fat type influences fatty acid composition of rat pancreatic membranes, in association with modulation of secretory activity and cell signalling in viable acini. We aimed to confirm whether AR42J cells are a valid model to study the interactions between lipids and pancreatic acinar cell function. For this purpose we have i) compared the baseline membrane fatty acid composition of AR42J cells with that of pancreatic membranes from rats fed a standard chow; ii) investigated if fatty acids in AR42J membranes can be modified in culture; and iii) studied if similar compositional variations that can be evoked in rats when dietary fat type is changed, occur in AR42J cells by modifying the fatty acids added to the medium. We also examined if the differentiation of AR42J cells with dexamethasone is relevant and if this treatment influences the biological response. And we analyzed the effects of different periods of adaptation to fatty acids in medium on the biological function of these cells. Finally, we investigated if different agents (interleukin-6 and bile acids) involved in oxidative-inflammatory processes, such as acute pancreatitis, affect differentially cell function depending on the membrane fatty acid profile.

Weaning Wistar rats were fed for 8 weeks either a commercial chow (C) or semi-purified diets containing virgin olive oil (VOO) or sunflower oil (SO) as fat source. AR42J cells were cultured for 72 h or 144 h in medium containing unmodified fetal calf serum (FCS, AR42J-C), FCS enriched with 18:1 n-9 or FCS enriched with 18:2 n-6 in presence or absence of dexamethasone. Fatty acid analysis of crude membranes from rat pancreas and AR42J cells was performed by gas-liquid chromatography (Audi *et al.*, 2007). For the study of the biological function of AR42J cells, the pancreatic secretagogue CCK-8 was employed. Interleukin-6 (IL-6) and bile acid effects were examined, respectively, after chronic and acute treatment. A modification of the Bernfeld technique was used to determine amylase activity in supernatant fractions after incubation of AR42J cells at 37°C for 50 min with CCK-8 and/or bile acids. Changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration (expressed as F340/F380) evoked by CCK-8 in fura-2 AM-loaded AR42J cells were assessed by ratiometric epifluorescence microscopy. LDH activity in the supernatant of cells incubated at 37°C for 50 min with CCK-8 and/or bile acids was determinate with a commercial

kit. Data were analyzed by a Student's *t*-test ( $p < 0.05$  were considered statistically significant) or by one-way analysis of variance (ANOVA).

The results of this thesis show the existence of some differences in the fatty acid composition of membranes from C-rat pancreas and AR42J-C cells than can be partly explained by variations in the amount of fatty acids in the extracellular environment. Supplementation of FCS with 18:1 n-9 or 18:2 n-6 changed the membrane fatty acid spectrum of AR42J cells in a manner that resembles the pattern found, respectively, in VOO and SO rats. Both the treatment with dexamethasone and the addition of fatty acids to the culture medium changed the membrane fatty acid profile in association with different secretory effects. A negative correlation between basal amylase secretion and membrane unsaturation index was found in undifferentiated AR42J cells. Overall, our data indicate that, compared with the other treatment groups, differentiated AR42J cells adapted for 72 h to different fatty acids (oleic or linoleic acid) constitute the best model to carry out physiological and pathophysiological studies aiming to investigate the modulatory influence of membrane compositional changes on acinar cell function. In addition, the present results corroborate that the effects of IL-6 and bile acids on such parameters as CCK-8-stimulated amylase release and cytosolic calcium mobilisation depend, at least in part, on membrane fatty acid profile.

It is logical that a different fatty acid composition of the membranes leads to different responses, because these molecules are potent regulators of cell function, mainly at three levels:

- Modulation of the activity of membrane proteins (receptors, enzymes, carriers...) through changes in bulk lipid fluidity or specific interactions between proteins and the lipid microenvironment
- Participation in cell signalling. Several intracellular signals are initiated in membranes phospholipids (such as those involving IP<sub>3</sub>, cytosolic Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol, products of lipid peroxidation, etc.), so their fatty acid composition may modulate different transduction pathways.

- Regulation of gene expression. There are transcription factors regulated specifically by fatty acids. In mammals some of these factors include PPAR $\alpha$ , - $\beta$  y - $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptors*), HNF4 $\alpha$  (*hepatic nuclear factor-4- $\alpha$* ), NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) y SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein-1c*).

In conclusion, the AR42J cell line, differentiated with dexamethasone and cultured for 72 h in a medium with different fatty acid composition, constitutes a valid model and a useful tool to assess the effects of dietary fat on membrane compositional changes and their consequences on cell function and susceptibility to specific noxious agents involved in inflammatory pancreatic diseases.







## **CONCLUSIONES**

1. El enriquecimiento del medio de cultivo con ácido oleico (18:1 n-9) o ácido linoleico (18:2 n-6) produce cambios en el espectro de ácidos grasos de las membranas de las células AR42J de una manera similar al patrón encontrado en ratas alimentadas con dietas ricas en aceite de oliva o aceite de girasol, respectivamente.
2. La dexametasona, *per se*, induce cambios en la composición de ácidos grasos de membrana de las células AR42J, y modula la adaptación de estas membranas a los ácidos grasos del medio de cultivo. Así, las células AR42J diferenciadas incorporan a sus membranas mayores cantidades del ácido graso predominante en el medio (oleico o linoleico, en cada caso) en comparación con las no diferenciadas.
3. En las células AR42J, al igual que ocurre en ratas, la adaptación de la membrana plasmática a los ácidos grasos presentes en el medio depende de la duración del periodo de adaptación.
4. La diferenciación de las células AR42J con dexametasona modifica la relación existente entre el grado de insaturación de membrana y la secreción basal de amilasa.
5. La diferenciación de las células parece dar lugar a cambios funcionales importantes en los mecanismos globales de secreción. Estos cambios producidos por la diferenciación parecen ser dependientes del tipo de ácido graso incorporado a la membrana.
6. Esta línea celular de un pancreatoma de rata, diferenciada con dexametasona y adaptadas sus membranas durante 72 horas, en su perfil lipídico, a distintos ácidos grasos presentes, de forma mayoritaria, en aceites de consumo humano (oleico, en aceite de oliva y linoleico, en aceite de girasol), es un buen modelo para el estudio de la influencia de los cambios en el perfil lipídico de la



membrana inducidos por el tipo de grasa de la dieta sobre distintos aspectos de la funcionalidad celular, tanto frente a estímulos fisiológicos como patológicos.

7. La modificación del perfil lipídico de las membranas de las células AR42J por enriquecimiento selectivo de ácidos grasos en el medio, da lugar a un comportamiento diferente de la respuesta celular (secreción de amilasa y concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ ) por la presencia de agentes que intervienen en procesos oxidativo-inflamatorios como la interleuquina-6 (IL-6) y ácidos biliares (AB).

### **CONCLUSIÓN GENERAL**

La línea celular AR42J diferenciada con dexametasona y cultivada durante 72 horas en un medio con diferente composición en ácidos grasos es un buen modelo para estudiar los efectos de la grasa dietética sobre los cambios en la composición de las membranas celulares y sus consecuencias sobre la función celular y la susceptibilidad al daño inducido por distintos agentes nocivos implicados en enfermedades inflamatorias del páncreas.

## **CONCLUSIONS**

1. The enrichment of culture medium with oleic acid (18:1 n-9) or linoleic acid (18:2 n-6) modifies the fatty acid spectrum of AR42J cell membranes in a manner that resembles the pattern found in pancreatic membranes of rats fed diets rich in olive oil or sunflower oil, respectively.
2. Dexamethasone, *per se*, induces changes in membrane fatty acid composition of AR42J cells, and modulates the adaptation of these membranes to the fatty acid composition of the culture medium. Thus, differentiated AR42J cells incorporate to their membranes a higher amount of the main fatty acid in the medium (oleic or linoleic acid) compared with undifferentiated cells.
3. In AR42J cells, like in rats, membrane adaptation to fatty acids present in the medium depends on the length of the adaptation period.
4. Differentiation of AR42J cells with dexamethasone modifies the relationship between the unsaturation index of cellular membranes and basal amylase secretion.
5. Differentiation of AR42J cells evokes significant functional changes in the global mechanisms of secretion. These changes seem to depend on the type of fatty acid incorporated to the membrane.
6. This rat pancreatoma cell line, differentiated with dexamethasone and adapted for 72 h to different fatty acids abundant in dietary fats (oleic acid in olive oil and linoleic acid in sunflower oil) constitutes a suitable model to conduct physiological and pathophysiological studies aiming to investigate the modulatory influence of membrane compositional changes on acinar cell function.
7. The changes in AR42J membrane lipid profile induced by enrichment of the culture medium with specific fatty acids are associated with a different

behaviour of cell response (amylase secretion and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration) in the presence of agents involved in oxidative-inflammatory processes, such as interleukin-6 and bile acids.

### **GENERAL CONCLUSION**

The AR42J cell line differentiated with dexamethasone and cultured for 72 hours in a medium with different fatty acid composition is a useful model to assess the effects of dietary fat on membrane compositional changes and their consequences on cell function and susceptibility to damage induced by different noxious agents involved in inflammatory diseases of the pancreas.





# Membrane Lipid Composition of Pancreatic AR42J Cells: Modification by Exposure to Different Fatty Acids

NAMA'A AUDI,\* MARÍA D. MESA,† MARÍA A. MARTÍNEZ,\* EMILIO MARTÍNEZ-VICTORIA,\*  
MARIANO MAÑAS,\* AND MARÍA D. YAGO\*<sup>1</sup>

*\*Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology, University of Granada, Granada, Spain; and †Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Nutrition and Food Technology, University of Granada, Granada, Spain*

Dietary fat type influences fatty acids in rat pancreatic membranes, in association with modulation of secretory activity and cell signalling in viable acini. We aimed to confirm whether AR42J cells are a valid model to study the interactions between lipids and pancreatic acinar cell function. For this purpose we have (i) compared the baseline fatty acid composition of AR42J cells with that of pancreatic membranes from rats fed a standard chow; (ii) investigated if fatty acids in AR42J membranes can be modified in culture; and (iii) studied if similar compositional variations that can be evoked in rats when dietary fat type is altered occur in AR42J cells. Weaning Wistar rats were fed for 8 weeks either a commercial chow (C) or semi-purified diets containing virgin olive oil (VOO) or sunflower oil (SO) as fat source. AR42J cells were incubated for 72 hrs in medium containing unmodified fetal calf serum (FCS, AR42J-C cells), FCS enriched with 18:1 n-9 (AR42J-O cells), or FCS enriched with 18:2 n-6 (AR42J-L cells). Fatty acids in crude membranes from rat pancreas and AR42J cells were determined by gas-liquid chromatography. Differences in membrane fatty acids between C rats and AR42J-C cells can be explained in part by variations in the amount of fatty acids in the extracellular environment. Supplementation of FCS with 18:1 n-9 or 18:2 n-6 changed the fatty acid spectrum of AR42J cells in a manner that resembles the pattern found, respectively, in VOO and SO rats, although AR42J-L cells were unable to accumulate 20:4 n-6. The AR42J cell line can be a useful tool to assess the effect of membrane compositional changes on acinar cell function. However, differences in baseline characteristics, and perhaps fatty acid metabolism, indicate that results obtained in AR42J

cells should be confirmed with experiments in the whole animal. *Exp Biol Med* 232:532–541, 2007

**Key words:** dietary fat; virgin olive oil; sunflower oil; AR42J; rat pancreas; cell model; membrane fatty acids; oleic acid; linoleic acid

## Introduction

Recent research in nutritional science is trying to elucidate the effect of dietary lipids on membrane composition and function. Membrane fatty acid composition can be modified in many different types of mammalian cells. The changes can be of sufficient magnitude to affect a number of cellular functions, including carrier-mediated transport, transduction pathways, activity of membrane-bound enzymes, receptor binding, and exocytosis processes (1–4). Many of the functional responses are probably caused directly by the membrane lipid structural changes, which affect either bulk lipid fluidity or specific lipid domains. The conformation of some transporters, receptors, and enzymes may be sensitive to changes in lipid microenvironment, thus leading to changes in activity.

Studies in animal models have provided evidence about the effects of dietary fats on physiologic and pathologic processes. Work in our laboratory confirmed that the type of dietary fat strongly influences the fatty acid composition of rat (5) and rabbit (6) pancreatic membranes. In the rat study, this was accompanied by a change in the secretory activity and mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$  stimulated by cholecystokinin-octapeptide (CCK-8) in viable pancreatic acini (5, 7). Interestingly, by using the method of direct cannulation of the pancreatic duct in anaesthetized rats, we have been able to find a modification of CCK-induced secretory output as a function of the type of fat previously fed (8), which indicates that the modulating effect of this nutrient on exocrine pancreatic function is not limited to the cellular level. In a more recent study (9), we have observed that chronic intake of diets differing in the fat type can also

---

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (BFI2002-02772) and from Junta de Andalucía (Ayuda Retorno M.D.Y.).

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed at Institute of Nutrition and Food Technology, C/ Ramón y Cajal 4, 18071 Granada, Spain. E-mail: mdyago@ugr.es

---

Received September 8, 2006.  
Accepted October 31, 2006.

---

1535-3702/07/2324-0532\$15.00  
Copyright © 2007 by the Society for Experimental Biology and Medicine

---

influence the responsiveness of acinar cells to acetylcholine, likely in relation to dietary-induced changes in cell membrane composition.

The effects of lipid modification on cell function are complex. Not only can they vary from one tissue to another, but they also are not exerted uniformly on all processes in a single cell line. For this reason, it is not possible to make generalizations or to predict how a given system will respond to a particular lipid alteration. Within this context, cell culture appears to be a good approach for investigating the molecular aspects of this problem. A much wider array of modifications is possible in cultured cells than in intact animals, and the environmental conditions can be controlled better. Because of homogeneity in morphology and composition, cell culture systems provide us with an elevated number of identical replicas, thus avoiding the serious problem of samples heterogeneity inherent to animal experimentation. Another valuable advantage, in terms of budget and time economy, is that animals require long periods of adaptation to dietary fats, whereas adaptation of cultured cells is achieved in a few days. In addition, ethical issues raised by animal experimentation support the use of cell culture. While cultured cells and tissues cannot replace the *in vivo* systems, they are valid alternative models in many situations.

The AR42J cell line is the only currently available cell line that maintains many characteristics of normal pancreatic acinar cells, such as the synthesis and secretion of digestive enzymes (10). AR42J cells show receptor expression and signal transduction mechanisms parallel to those of normal pancreatic acinar cells (11), and have been widely used to study secretion, signal transduction, cytoskeleton function, apoptosis, and pancreatitis responses of the exocrine pancreas (12–18). Thus, we thought that this cell line could be a suitable *in vitro* model for our purpose of examining the molecular mechanisms of the effect of dietary lipids on membrane composition and cell function. Surprisingly, we found that, in spite of the wide usage in recent years, no information is available on the baseline lipid composition of AR42J cell membranes, and there are no attempts made in recorded scientific literature to modify the fatty acid composition of AR42J cells in culture. Our aim in the current study was to determine the membrane fatty acid composition of AR42J cells, to investigate whether these cells adapt their membranes after exposure to different fatty acids in the culture medium, and to confirm if this process is similar to the adaptation of the rat exocrine pancreas that occurs when dietary fat intake is modified (5, 8, 9). To achieve our objectives, two separate groups of weaning rats were fed over 8 weeks on diets containing either virgin olive oil or sunflower oil as the fat source. In turn, culture medium for AR42J cells was supplemented with 18:1 n-9 or 18:2 n-6, the two major components of olive oil and sunflower oil, respectively.

## Materials and Methods

**Materials.** Unless otherwise stated, all chemicals and solvents of the highest grade available were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Merck (Darmstadt, Germany).

**Animals and Diets.** Twenty-seven male weaning Wistar rats (weight 40–55 g; Animal Farm of the University of Granada, Granada, Spain) were divided into three groups (9 each) so that the average weight per group was the same. A first group, which served as control (C), was fed for 8 weeks with a standard cereal-based chow for this species (Panlab A04, Panlab Laboratories, Barcelona, Spain). The chow was composed of 15.4% protein, 2.9% fat, 60.5% carbohydrates, 3.9% fiber, 5.3% minerals, and 12% water (data from the manufacturer's analyses). The other two groups of rats were fed over the same period with two semi-purified diets that were a modified version of the AIN-93G diet (19). These semi-purified diets were prepared in powdered form by mixing the fresh, chemically defined ingredients, according to (%): casein, 20; maize starch, 36.75; dextrose, 13.2; sucrose, 10; cellulose, 5; fat, 10; L-cystine, 0.3; choline bitartrate, 0.25; AIN-93G mineral mixture, 3.5; AIN-93G vitamin mixture, 1. The sources of fat were commercial edible oils obtained locally: virgin olive oil (VOO rats, Fedeoliva, S.A., Jaén, Spain) or sunflower oil (SO rats, Koipe, S.A., Jaén, Spain). The VOO and SO diets were prepared at the Nutrition Unit of the Animal Farm (University of Granada, Granada, Spain), packed in plastic bags, sealed, and sent to our laboratory. Upon arrival, aliquots were taken for determination of water content by drying to constant weight in oven at 105°C. Average water content was 10% in both semi-purified diets. All diets were stored in darkness at 4°C until used to avoid peroxidation. The fatty acid composition of the diets (Table 1) was determined by gas-liquid chromatography (GLC) as described later for the membrane fractions.

During the 8-week adaptation period to the diets, animals were housed individually in a temperature-controlled room ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), kept on a 12:12-hr light:dark cycle and given free access to water and food. All procedures were approved by the Ethics Committees of the University of Granada and the Spanish Ministry of Science and Technology. Animals were handled according to the guidelines of the Spanish Society for Laboratory Animal Sciences and killed humanely.

**Cell Culture.** Rat pancreatoma AR42J cell line, proceeding from the European Collection of Cell Cultures (ECACC N°: 93100618), was supplied by the Cell Bank of the Scientific Instrumentation Centre at the University of Granada (CIC-UGR, Granada, Spain). Cells were routinely cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum (FCS) and 2 mM glutamine. AR42J cells were used following treatment with 100 nM dexamethasone in culture medium for 72 hrs to induce differentiation (13, 14).

Maintenance, culture, and chronic treatments (dexamethasone and fatty acids) of AR42J cells were carried out in the Tissue and Cell Culture Unit of the CIC-UGR (Granada, Spain) in order to optimize cell production while avoiding the risk of bacterial contamination. Cells were transferred to our laboratory for analyses.

Membrane fatty acid modifications in AR42J cells were evoked during the 72-hr differentiation period according to a simple protocol based on a modification of the method of Chow et al. (20). Briefly, fetal calf serum (FCS) was enriched in either 18:1 n-9 or 18:2 n-6 by addition of necessary volume of stock solutions (100 mM in absolute ethanol). This mixture was equilibrated for 1 hr at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. During this time, 3 sonication pulses of 30 secs each were applied to facilitate binding of fatty acids to FCS proteins. FCS enriched with 18:1 n-9 or 18:2 n-6 was then added to the culture medium (AR42J-O and AR42J-L cells, respectively). Final concentration of added fatty acids in medium was 50 μM. Fatty acids were obtained from Sigma and were approximately 99% pure and cell culture tested. The pH of the medium did not differ with the addition of fatty-acid enriched serum. Control cells (AR42J-C cells) were fed the culture medium containing the intact, unmodified FCS. The viability of fatty acid-supplemented and not supplemented cells was found to be 95%–98% by trypan blue exclusion method.

**Collection of Crude Membranes.** At the end of the 8-week feeding period, overnight-fasted rats were killed by cervical dislocation. Each pancreas was quickly removed; trimmed free of fat, connective tissue, and lymph nodes in cold saline solution (0.9% NaCl); blotted, and weighed. AR42J cells were detached mechanically from culture flasks by gentle pipetting and washed twice in cold phosphate-buffered saline (PBS). Collection of crude membranes from rat pancreas and AR42J pancreatic acinar cells was accomplished by established methods (21).

**Analysis of Cell Membranes.** Lipid extraction and fatty acid methylation was done in a one-step reaction (22). A GLC system, model HP 5890 series II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), equipped with an automatic injector and a flame ionization detector, was used to analyze fatty acids as methyl esters. GLC was performed using a 60-m-long capillary column (32 mm i.d. and 20 mm thickness) impregnated with Sp 2330 FS (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

**Electron Microscopy.** AR42J cells were processed by conventional procedures for electron microscopy (23) at the Biological Sample Preparation Laboratory of the CIC-UGR (Granada, Spain). In brief, cells were prefixed for 2 hrs at 0°–4°C in 1.5% glutaraldehyde and 1% formaldehyde in 50 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.4). The cultures were postfixed with 1% OsO<sub>4</sub> and 1% potassium ferricyanide for 1 hr at 0°–4°C in the dark, and passed through 0.15% tannic acid in the above buffer, followed by treatment with 2% uranyl acetate for 2 hrs in darkness. Increasing concentrations of ethanol (50, 75, 90, 95, and 3× 100%)

**Table 1.** Fatty Acid Composition of the Experimental Diets and Fetal Calf Serum (FCS) Used, Respectively, in the Rat and Cell Culture (AR42J) Studies<sup>a</sup>

Fatty acid	Rat study			AR42J study
	VOO diet	SO diet	Commercial chow	FCS <sup>b</sup>
16:0	9.81	6.35	20.27	28.24
16:1 n-7	0.63	0.12	0.86	2.40
18:0	3.96	4.37	6.43	17.28
18:1 n-9	76.75	31.19	28.08	21.37
18:2 n-6	6.81	55.92	34.49	6.78
18:3 n-3	0.66	0.07	2.64	0.00
SFA	14.02	10.87	29.21	57.06
MUFA	77.67	31.48	31.21	25.68
PUFA	8.31	57.65	39.58	17.26
UFA	85.98	89.13	70.79	42.94
SFA/UFA	0.16	0.12	0.41	1.33

<sup>a</sup> Values are percentages of total fatty acid content (mean values of four replicates). VOO, virgin olive oil; SO, sunflower oil; FCS, fetal calf serum; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids.

<sup>b</sup> Intact, unmodified FCS.

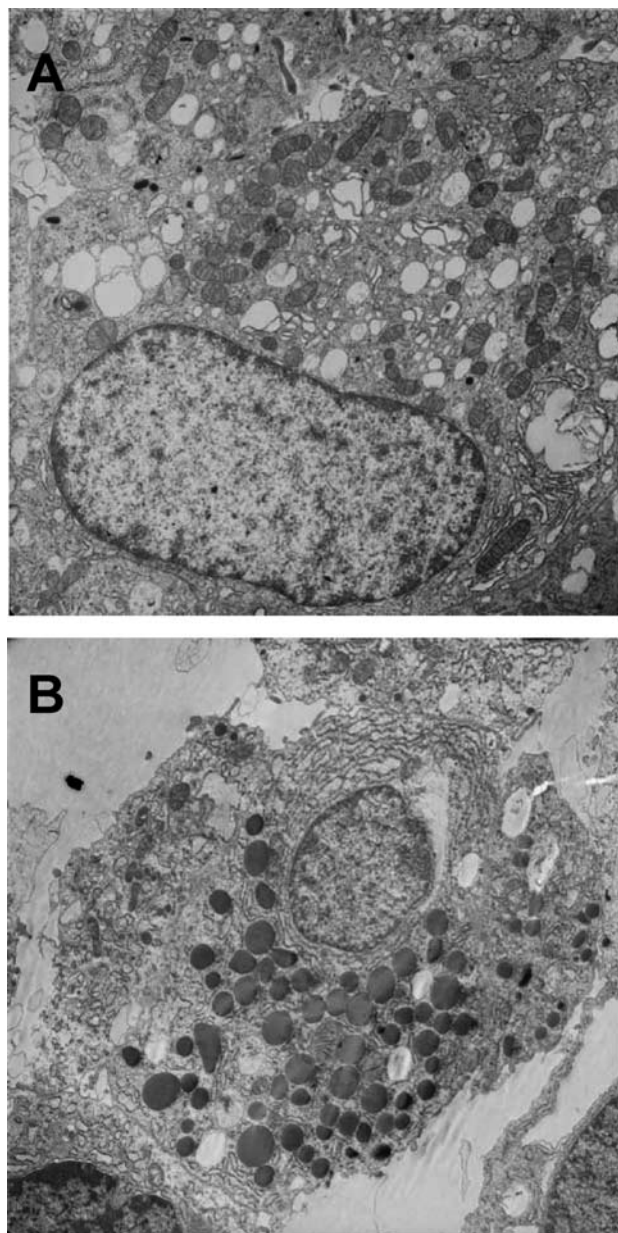
were used (5 mins each, 0°–4°C) in the process of dehydration. The samples were then embedded in Epon epoxy resin through an ethanol:Epon series. Ultra-thin sections (500–700 μm) were cut, collected on copper grids, poststained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Zeiss EM 902 transmission electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) at 80 kV by personnel of the Microscopy Service of the CIC-UGR (Granada, Spain).

**Statistical Analysis.** Unless otherwise expressly noted, results in the text, tables, and graphs are reported as means ± SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare membrane fatty acid content between groups, and Tukey's HSD (honestly significant difference) was used for all *post hoc* comparisons (SPSS for Windows, version 13.0.1, 2005; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Values were considered to be significantly different when  $P < 0.05$ .

## Results

**Transmission Electron Microscopy (TEM).** As a part of our objective of finding a cultured line of pancreatic acinar cells that could serve as an appropriate *in vitro* model to study the interaction between dietary lipids and membrane composition and function, it was pertinent to confirm dexamethasone-induced differentiation of AR42J cells. Figure 1 shows a typical AR42J cell cultured with unmodified, intact, fetal calf serum in the absence (A) or presence (B) of 100 nM dexamethasone. At the ultra-structural level, the most striking effect of dexamethasone treatment for 72 hrs concerned the secretory granules. The results from our analysis showed that whereas in non-treated





**Figure 1.** Electron micrograph of a typical AR42J cell cultured with unmodified fetal calf serum in the absence (A) or presence (B) of 100 nM dexamethasone for the 72 hrs prior to sample collection. Magnification:  $\times 4400$  for both A and B.

cells zymogen granules were rarely seen (Fig. 1A), in dexamethasone-treated cells the granules were very prominent, both in number and size (Fig. 1B). In addition, untreated cells looked relatively undifferentiated, with sparse rough endoplasmic reticulum consisting of vesicles and isolated small cisternae (Fig. 1A). Dexamethasone treatment, however, increased the amount of rough endoplasmic reticulum, which appeared as large stacked cisternae (Fig. 1B). So, the results from our analyses indicate that dexamethasone induced in this study the differentiation of AR42J cells towards an exocrine phenotype similar to that of a rat pancreatic acinar cell. There was

no difference in the ability of dexamethasone to induce AR42J cell differentiation in the presence of fatty acid-supplemented serum compared with the unsupplemented one.

**Baseline Fatty Acid Profiles of Crude Membranes from Rat Pancreas and AR42J Cells.** Fatty acid profile of membranes from differentiated control AR42J cells (AR42J-C cells) and control rat (C rat) pancreas is detailed in Table 2. Major membrane fatty acids in AR42J-C cells, listed in decreasing order of abundance, were (mean values): 16:0 (28.05%), 18:1 n-9 (25.69%), and 18:0 (16.41%). Content of 18:3 n-3, 20:4 n-6, 16:1 n-7, 14:0, 18:2 n-6, and 20:0 was between 2%–4%. Among minor fatty acids (<2%) in membranes from AR42J-C cells, those that should be noted include: 22:6 n-3 (mean value of 1.87%), 20:3 n-6 (1.44%), 22:0 (1.39%), and 24:0 (1.19%).

Fatty acids in pancreatic membranes from C rats, listed in decreasing order of abundance, were (mean values): 16:0 (31.14%), 20:4 n-6 (18.10%), 18:2 n-6 (14.52%), 18:1 n-9 (13.84%), 18:0 (10.07%), and 16:1 n-7 (5.45%). For the rest of fatty acids detected, content was lower than 2% (see Table 2).

Comparison among C rats and AR42J-C cells showed that the percentage of most fatty acid differed significantly ( $P < 0.05$ ), with only minor fatty acids such as 15:0, 17:0, 20:2 n-6, and 21:0 being similar. The most abundant fatty acid in both AR42J-C cells and pancreatic membranes from C rats was 16:0, although the content in rats ( $31.14 \pm 0.32\%$ ) was significantly greater ( $P < 0.05$ ) than that in cultured cells ( $28.05 \pm 0.21\%$ ). After 16:0, leading fatty acids in the rat were (mean values): 20:4 n-6 (18.10% vs. 3.80% in AR42J-C cells,  $P < 0.05$ ) and 18:2 n-6 (14.52% vs. 3.33% in AR42J-C cells,  $P < 0.05$ ). In turn, leading fatty acids (after 16:0) in cultured AR42J-C cells were: 18:1 n-9 (25.69% vs. 13.84% in the rat,  $P < 0.05$ ) and 18:0 (16.41% vs. 10.07% in the rat,  $P < 0.05$ ).

Percent values for fatty acids were also distributed differently in rat and AR42J membranes. In the rat, five fatty acids exhibited percent values higher than 10% (16:0, 20:4 n-6, 18:2 n-6, 18:1 n-9, and 18:0), then there was 16:1 n-7 with approximately 5%, and the remaining fatty acids showed values lower than 1.5%. In contrast, there are three major fatty acids in AR42J-C cells with values higher than 10% (16:0, 18:1 n-9, and 18:0), and six fatty acids in the range of 2%–4%, the rest being minor fatty acids.

Differences in individual fatty acids between rat and cultured cells are reflected in indices, as summarized in Figure 2. AR42J-C cells had a higher ( $P < 0.05$ ) proportion of saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA), whereas total PUFA and, particularly, n-6 PUFA percentages were higher ( $P < 0.05$ ) in rat pancreas (Fig. 2A). All percent ratios were also significantly ( $P < 0.05$ ) different (Fig. 2B).

#### Effect of Feeding the Experimental Diets for 8

**Table 2.** Fatty Acid Profile of Pancreatic Crude Membranes from Control Rats (C Rats) and Control AR42J Cells (AR42J-C Cells)<sup>a</sup>

Fatty acid	C rats <sup>b</sup>	AR42J-C cells <sup>c</sup>
6:0	0.00 ± 0.00 *	0.37 ± 0.04
10:0	0.00 ± 0.00 *	0.45 ± 0.06
12:0	0.08 ± 0.01 *	0.46 ± 0.03
14:0	1.36 ± 0.04 *	3.40 ± 0.20
14:1 n-5	0.09 ± 0.01 *	0.00 ± 0.00
15:0	0.21 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.34 ± 0.02
16:0	31.14 ± 0.32 *	28.05 ± 0.21
16:1 n-7	5.45 ± 0.12 *	3.47 ± 0.20
17:0	0.23 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.34 ± 0.02
18:0	10.07 ± 0.10 *	16.41 ± 0.26
18:1 n-9	13.84 ± 0.30 *	25.69 ± 0.41
18:2 n-6	14.52 ± 0.85 *	3.33 ± 0.12
18:3 n-6	0.39 ± 0.03 *	0.00 ± 0.00
18:3 n-3	0.13 ± 0.01 *	3.83 ± 0.20
20:0	0.22 ± 0.02 *	2.29 ± 0.17
20:1 n-9	0.35 ± 0.04 *	0.00 ± 0.00
20:2 n-6	0.19 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.19 ± 0.02
20:3 n-6	0.43 ± 0.02 *	1.44 ± 0.15
20:4 n-6	18.10 ± 0.23 *	3.80 ± 0.11
20:5 n-3	0.35 ± 0.01 *	0.58 ± 0.02
21:0	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.00 ± 0.00
22:0	0.24 ± 0.03 *	1.39 ± 0.10
22:1 n-9	0.00 ± 0.00 *	0.50 ± 0.03
22:6 n-3	1.04 ± 0.04 *	1.87 ± 0.10
23:0	0.05 ± 0.01 *	0.33 ± 0.02
24:0	0.48 ± 0.02 *	1.19 ± 0.06
24:1 n-9	1.06 ± 0.01 *	0.85 ± 0.03

<sup>a</sup> Values are percentages of total fatty acid content (means ± SEM) C rats: *n* = 9; AR42J-C cells: *n* = 18 (from 6 batches of cells).

<sup>b</sup> C rats were fed a commercial chow for 8 weeks after weaning.

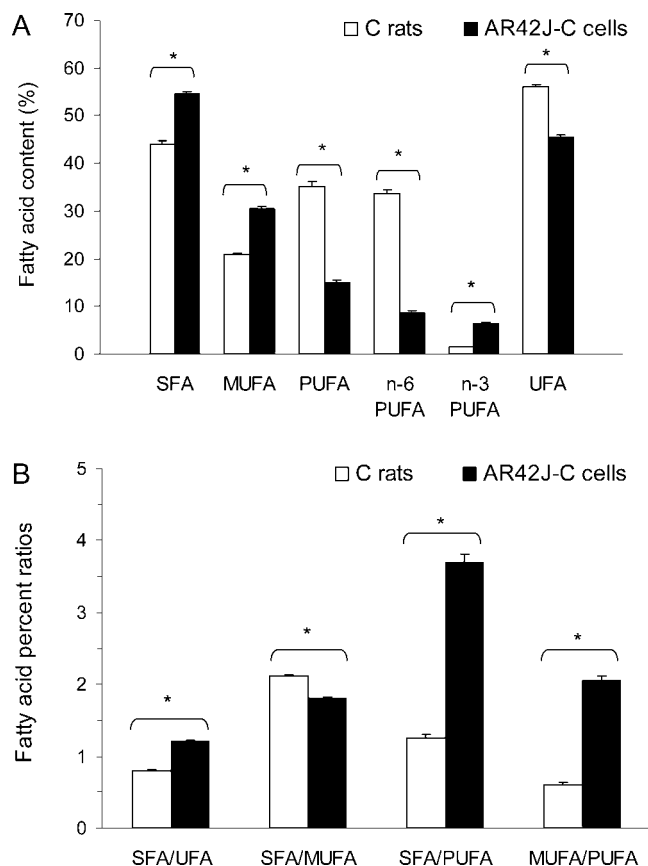
<sup>c</sup> AR42J-C cells were fed the culture medium containing unmodified fetal calf serum for the 72-hr period (differentiation period) before the experiments.

<sup>d</sup> Not significant.

\* *P* < 0.05 compared with membranes from AR42J-C cells.

**Weeks on Rat Pancreatic Crude Membranes.** The fatty acid profile of pancreatic membranes (Table 3 and Fig. 3) was profoundly influenced by dietary treatments. Compared to control (C) rats, pancreatic membranes of rats fed the virgin olive oil (VOO) diet displayed higher (*P* < 0.05) levels of 18:1 n-9 and 20:5 n-3, and lower (*P* < 0.05) levels of 16:0, 16:1 n-7, 18:2 n-6, and 20:4 n-6 (Table 3). Content of 14:0, 18:0, 18:3 n-3, and 22:6 n-3 did not vary among C rats and VOO rats. As shown in Fig. 3A, the VOO diet caused a significant increase in MUFA (due to 18:1 n-9) compared to C rats, which was balanced by a decrease (*P* < 0.05) in SFA (due to 16:0) and a decrease in n-6 PUFA (due to both 18:2 n-6 and 20:4 n-6).

When compared with rats fed the standard chow (C rats), pancreatic membranes of rats given the sunflower oil diet (SO) for 8 weeks showed (Table 3) a significant (*P* < 0.05) increase in 18:0, 18:2 n-6, and 20:4 n-6, together with a significant decrease in 16:0, 16:1 n-7, 20:5 n-3, and 22:6 n-3. Values for 14:0, 18:1 n-9, and 18:3 n-3 were similar in C and SO rats. As summarized in Figure 3A, feeding rats



**Figure 2.** Fatty acid profile of pancreatic crude membranes from control rats (C rats) and control AR42J cells (AR42J-C cells). C rats were fed with a commercial chow for 8 weeks after weaning. AR42J-C cells were fed the culture medium containing the unmodified fetal calf serum for the 72 hrs prior to sample collection. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids. (A) Fatty acid indices are expressed as percentages of total fatty acid content. (B) Fatty acid indices are expressed as percent ratios. Values are means ± SEM. C rats: *n* = 9; AR42J-C cells: *n* = 18 (from 6 batches of cells). Asterisks above the bars denote significant differences (*P* < 0.05) between C rats and AR42J-C cells.

the SO diet instead of a commercial chow (C) increased n-6 PUFA in membranes, not only due to 18:2 n-6, the most abundant fatty acid in sunflower oil, but also through the contribution of its main metabolite, 20:4 n-6. The increase in n-6 PUFA (Fig. 3A) was achieved at the expense of SFA (16:0) and MUFA (16:1 n-7).

Compared with the other two groups, VOO rats showed the highest values for 18:1 n-9, MUFA, and MUFA/PUFA and the lowest values for SFA/MUFA. In turn, membranes prepared from SO rats displayed the highest values for 18:2 n-6, PUFA, n-6 PUFA, and SFA/MUFA. The SFA/UFA ratio, which showed a mean value of 0.78 in rats fed a standard chow (C rats), was significantly reduced after intake of the VOO and SO diets (Fig. 3B), reaching comparable values of 0.65 and 0.67, respectively. It is interesting that, despite marked differences in the content of a number of individual fatty acids as well as in total MUFA

**Table 3.** Selected Fatty Acids in Pancreatic Membranes from Rats Fed a Commercial Chow (C), a Virgin Olive Oil Diet (VOO) or a Sunflower Oil Diet (SO) for 8 Weeks After Weaning<sup>a</sup>

Fatty acid	C rats	VOO rats	SO rats
14:0	1.36 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.04 <sup>a</sup>
16:0	31.14 ± 0.32 <sup>a</sup>	27.01 ± 0.24 <sup>b</sup>	25.36 ± 0.20 <sup>c</sup>
16:1 n-7	5.45 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.84 ± 0.44 <sup>b</sup>	1.93 ± 0.17 <sup>b</sup>
18:0	10.07 ± 0.10 <sup>a</sup>	9.92 ± 0.30 <sup>a</sup>	12.26 ± 0.32 <sup>b</sup>
18:1 n-9	13.84 ± 0.30 <sup>a</sup>	32.41 ± 1.06 <sup>b</sup>	11.49 ± 0.72 <sup>a</sup>
18:2 n-6	14.52 ± 0.85 <sup>a</sup>	7.45 ± 0.14 <sup>b</sup>	22.21 ± 0.69 <sup>c</sup>
18:3 n-3	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>
20:4 n-6	18.10 ± 0.23 <sup>a</sup>	14.36 ± 0.93 <sup>b</sup>	21.46 ± 0.94 <sup>c</sup>
20:5 n-3	0.35 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>c</sup>
22:6 n-3	1.04 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>b</sup>

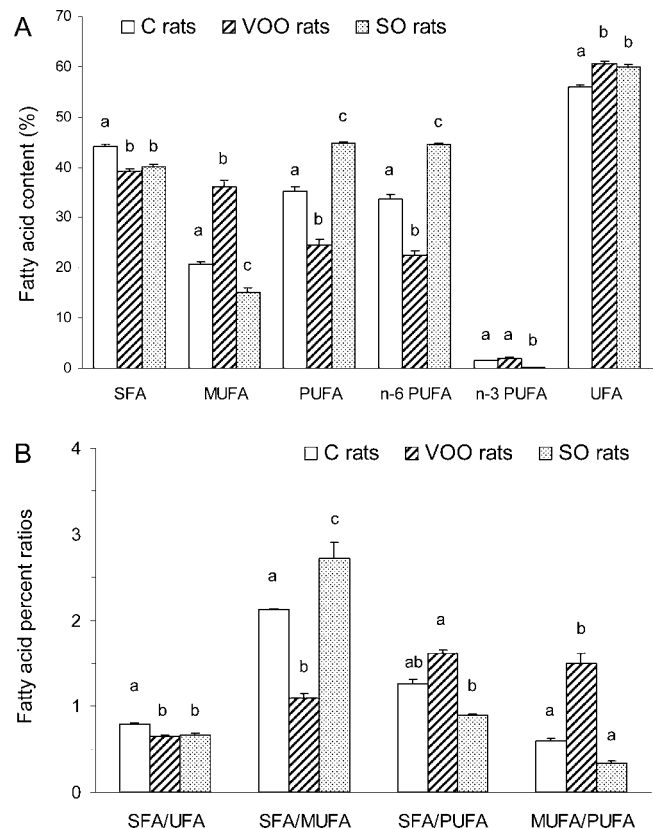
<sup>a</sup> Values are percentages of total fatty acid content (means ± SEM, *n* = 9 for all groups). For a particular row, values with different superscript letters are significantly different at *P* < 0.05.

and PUFA, the value for SFA/UFA was the same in VOO and SO animals.

**Effect of Supplementation of Culture Medium with 18:1 n-9 or 18:2 n-6 on the Fatty Acid Profile of AR42J Cells.** Table 4 and Figure 4 show the changes in membrane fatty acid composition of AR42J cells grown for 72 hrs with fetal calf serum (FCS) supplemented with either 18:1 n-9 (AR42J-O) or 18:2 n-6 (AR42J-L). Enrichment with those fatty acids profoundly influenced the fatty acid composition of AR42J cell membranes.

Compared to control cells (AR42J-C), addition of 18:1 n-9 to culture medium (AR42J-O) evoked a significant (*P* < 0.05) increase in the membrane content of 14:0, 18:1 n-9, and 18:3 n-3, and a significant (*P* < 0.05) decrease in 18:0, 20:4 n-6, 20:5 n-3, and 22:6 n-3. The proportion of 16:0, 16:1 n-7, and 18:2 n-6 did not vary among AR42J-O and AR42J-C cells (Table 4). Fatty acid indices (Fig. 4) summarize the effects of enrichment with 18:1 n-9. With this fatty acid in culture medium, the MUFA content of membranes increased significantly (due to 18:1 n-9) in comparison with control cells (AR42J-C), an increase that was compensated by a significant (*P* < 0.05) decrease in SFA (due to 18:0) and a significant decrease in n-6 PUFA (mainly due to 20:3 n-6 [data not shown] and 20:4 n-6).

Compared with cells grown in unmodified serum (AR42J-C), membranes of cells cultured in the presence of 50 μM 18:2 n-6 showed a significant (*P* < 0.05) increase in the proportions of 14:0 and 18:2 n-6 and a significant (*P* < 0.05) decrease in 18:0, 18:1 n-9, 20:4 n-6, 20:5 n-3, and 22:6 n-3. Percent values of 16:0, 16:1 n-7, and 18:3 n-3 did not change (Table 4). Indices (Fig. 4) outline the changes in membrane fatty acids evoked by supplementation with 18:2 n-6. We can see that compared with control cells, AR42J-L suffered a large increase in n-6 PUFA (Fig. 4A). This increase was due to the incorporation of 18:2 n-6 itself, given that 18:2 n-6 metabolites either remained unchanged (20:3 n-6, data not shown) or even decreased significantly



**Figure 3.** Fatty acid profile of pancreatic crude membranes from rats fed a commercial chow (C rats), a virgin olive oil diet (VOO rats) or a sunflower oil diet (SO rats) for 8 weeks after weaning. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids. (A) Fatty acid indices are expressed as percentages of total fatty acid content. (B) Fatty acid indices are expressed as percent ratios. Values are means ± SEM. *n* = 9 for all groups. For a given index, different letters above the bars denote significant differences (*P* < 0.05) between dietary groups.

(20:4 n-6, see Table 4). Increase in n-6 PUFA was done at the expense of SFA (18:0) and MUFA (18:1 n-9).

In comparison with the remaining two treatments, the presence of 18:1 n-9 in the culture medium (AR42J-O) evoked in cells the highest values for 18:1 n-9, MUFA, MUFA/PUFA, and SFA/PUFA and the lowest values for SFA/MUFA. In turn, membranes prepared from AR42J-L cells showed the highest values for 18:2 n-6, PUFA, n-6 PUFA, and SFA/MUFA and the lowest values for SFA/PUFA and MUFA/PUFA. The effect of adding 18:1 n-9 or 18:2 n-6 was similar in that both fatty acids decreased the SFA/UFA ratio of AR42J-C cells to a comparable degree (Fig. 4B), from a mean value of 1.20 (AR42J-C) to 1.04 in AR42J-O and 1.10 in AR42J-L.

## Discussion

Our previous experience with viable rat pancreatic acini (5, 7, 9, 24) indicated that a cultured line of pancreatic acinar cells would be beneficial to completely understand the interactions between dietary lipids and the exocrine

**Table 4.** Selected Fatty Acids in Membranes from Differentiated AR42J Cells Cultured for 72 Hours in Medium Containing Unmodified Serum (AR42J-C), Serum Enriched in 18:1 n-9 (AR42J-O), or Serum Enriched in 18:2 n-6 (AR42J-L)<sup>a,b</sup>

Fatty acid	AR42J-C	AR42J-O	AR42J-L
14:0	3.40 ± 0.20 <sup>a</sup>	4.58 ± 0.08 <sup>b</sup>	4.43 ± 0.09 <sup>b</sup>
16:0	28.05 ± 0.21 <sup>a</sup>	27.39 ± 0.10 <sup>a</sup>	28.14 ± 0.38 <sup>a</sup>
16:1 n-7	3.47 ± 0.20 <sup>a</sup>	3.85 ± 0.19 <sup>a</sup>	3.70 ± 0.16 <sup>a</sup>
18:0	16.41 ± 0.26 <sup>a</sup>	12.35 ± 0.33 <sup>b</sup>	13.04 ± 0.30 <sup>b</sup>
18:1 n-9	25.69 ± 0.41 <sup>a</sup>	32.40 ± 1.11 <sup>b</sup>	15.95 ± 0.22 <sup>c</sup>
18:2 n-6	3.33 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.39 ± 0.03 <sup>a</sup>	17.03 ± 0.21 <sup>b</sup>
18:3 n-3	3.83 ± 0.20 <sup>a</sup>	5.11 ± 0.36 <sup>b</sup>	3.78 ± 0.24 <sup>a</sup>
20:4 n-6	3.80 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.86 ± 0.06 <sup>b</sup>
20:5 n-3	0.58 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.06 <sup>b</sup>
22:6 n-3	1.87 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.88 ± 0.07 <sup>b</sup>

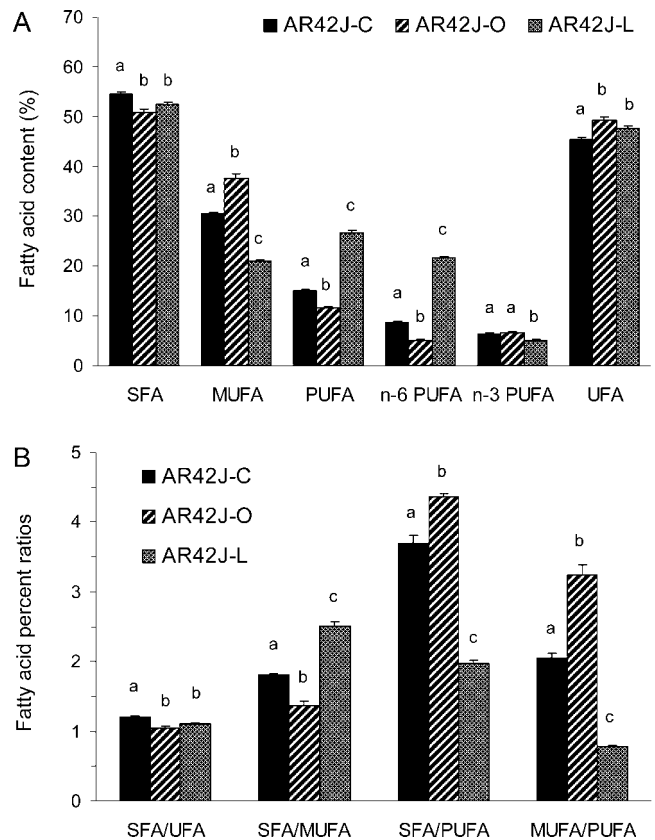
<sup>a</sup> Values are percentages of total fatty acid content (means ± SEM). AR42J-C: *n* = 18 (from 6 batches of cells); AR42J-O: *n* = 15 (from 5 batches); AR42J-L: *n* = 15 (from 5 batches).

<sup>b</sup> For a particular row, values with different superscript letters are significantly different at *P* < 0.05.

pancreas. For example, when working with the rat pancreas we observed that the yield of viable cells can be quite variable, which is likely due to the inability to rigidly control day-to-day differences in collagenase and mechanical digestion. Therefore, apart from other important advantages previously mentioned (see the Introduction section), switching to a continuous cell line could result in easier preparation and greater reproducibility. A main goal of this research was to find a cell model for studies on the influence of changes in membrane lipid composition upon transduction pathways and cell function.

AR42J cells are widely used in exocrine pancreatic research. However, there have been no previous reports on their membrane fatty acid composition. As a first step in confirming the validity of this cell line for our purposes, we determined the fatty acid profile of crude membranes from AR42J cells and compared this profile to that from rat pancreas. Then we investigated whether these cells were able to adapt their membranes to medium lipids (i.e. whether the fatty acid composition of AR42J membranes could be modified by altering the fatty acids to which they were exposed).

The results of the current study showed marked differences in baseline fatty acid profiles of membranes from rat pancreas and AR42J cells. Differences concerned not only major fatty acids (which, in addition, were not coincident) but also minor fatty acids and fatty acid indices. Initially, this could be explained by variations in the quantity of fatty acids in the extracellular environment. In this sense, we should note here that the lipid composition of the rat chow and fetal calf serum (FCS) differed widely. Membrane fatty acids in AR42J-C cells correlated closely with the amount available in our culture medium, with proportions of SFA, MUFA, PUFA, and most individual



**Figure 4.** Fatty acid profile of crude membranes from differentiated AR42J cells cultured for 72 hrs in medium containing unmodified serum (AR42J-C), serum enriched in 18:1 n-9 (AR42J-O) or serum enriched in 18:2 n-6 (AR42J-L). SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids. (A) Fatty acid indices are expressed as percentages of total fatty acid content. (B) Fatty acid indices are expressed as percent ratios. Values are means ± SEM. AR42J-C: *n* = 18 (from 6 batches of cells); AR42J-O: *n* = 15 (from 5 batches); AR42J-L: *n* = 15 (from 5 batches). For a given index, different letters above the bars denote significant differences (*P* < 0.05) between dietary groups.

fatty acids reflecting to a high degree those in serum. This confirms the findings in other mammalian cells (25) that fatty acid *de novo* synthesis is inhibited when the culture medium contains an adequate supply of fatty acids. Under these conditions, most cellular fatty acids seem to be derived directly from the material that is taken up from the extracellular medium.

In contrast to AR42J-C cells, fatty acids in pancreatic membranes from rats fed the standard chow (C rats) reflected dietary lipid composition, but not with such fidelity. Indeed, apart from a clear influence of age, physiological state, and tissue (26, 27), many *in vivo* studies have indicated that adaptation of biological membranes to dietary fat type does not depend only on fatty acid availability, since changes in the dietary fat consumed do affect the rate of phospholipid synthesis *de novo*, the redistribution of fatty acyl chains, and the activity of desaturases and elongases (for a review, see Ref. 1).

Unsaturation of fatty acyl chains is a major determinant of the physical properties of biological membranes. A main feature of membrane lipid composition that determines membrane fluidity is the ratio of saturated to unsaturated fatty acids (SFA/UFA). Optimal SFA/UFA ratio in mammalian plasma membranes is 1:1 (28) and it is desaturases, at least in part, that work to maintain this ratio within certain limits. The commercial chow given in our study to C rats was very rich in unsaturated fatty acids (SFA/UFA of approx. 0.4). Membrane data in this group of animals show how the physiological mechanisms work to cause a decrease in UFA and an increase in SFA (compared to chow composition) in such way that a SFA/UFA ratio of approximately 0.8 is achieved in pancreatic membranes. Together with a modest MUFA percentage, the high content of 16:0 and 18:0 in C rat membranes suggest down-regulation of  $\Delta 9$  desaturase by abundant linoleic acid in chow (29), with the subsequent accumulation of substrate. Contrary to MUFA and SFA, the proportion of total PUFA in membranes from C rats was similar to that in chow, with the particularity that 18:2 n-6, the major PUFA in diet (34.49%), was not preserved in pancreatic membranes (approx. 14%). Rather, the current results are indicative of efficient conversion of dietary 18:2 n-6 into 20:4 n-6, which accounted for approximately 18% of membrane fatty acids.

As previously observed by us (5, 8), in this study, adaptation of weaning rats to diets enriched in virgin olive oil (VOO) or sunflower oil (SO) markedly affected the fatty acid composition of pancreatic membranes. Thus, membranes in the VOO group were characterized by significantly higher levels of 18:1 n-9 and total MUFA compared with the other groups. In turn, consumption of the SO diet increased the proportion of n-6 PUFA such as 18:2 n-6 and 20:4 n-6. Membranes from both VOO and SO rats had a significantly lower SFA/UFA ratio compared to C rats. Still, SFA/UFA values kept within physiological limits ( $>0.6$ ), which suggest that membranes display a good degree of homeostasis in relation to this parameter, with increases of several major fatty acids being always balanced by a change in the level of other fatty acids.

A main objective of this work was to examine the validity of differentiated AR42J cells as a model to study the interactions between lipids and pancreatic acinar cell function. To fulfil this aim, we had to confirm (i) that the fatty acid composition of AR42J cells could be modified, and (ii) that similar compositional variations that can be evoked in rats when dietary fat type is altered occurred in AR42J cells. We now communicate for the first time that the fatty acid composition of crude membranes from AR42J cells can be altered in culture by adding specific fatty acids to the usual growth medium for 72 hrs. We included major fatty acids abundant in olive oil (18:1 n-9) or sunflower oil (18:2 n-6), that have been shown to alter pancreatic function in our previous *in vivo* and *in vitro* studies (5, 8). Compared with cells grown in standard conditions (AR42J-C cells), addition of 18:1 n-9 to the culture medium (AR42J-O cells)

increased significantly the proportion of this fatty acid in the membrane fraction, and 18:2 n-6 supplementation (AR42J-L cells) of the culture produced a significant increase in the 18:2 n-6 content.

A number of techniques have been developed for modifying the fatty acid composition of cells in culture. Fatty acids are toxic in the unbound form and are also very poorly soluble in water, so they are usually provided in the bound form (either to albumin or other protein) or in the form of liposomes. The most widely used method consists of the preparation of a fatty acid-BSA complex that is then added to serum-free (30) or serum-containing (31) media. Given that our protocol did not consider removing serum from the culture medium, we bound fatty acids directly to serum proteins. The method is simple and rapid, and did not appear to alter the main characteristics of the culture. Fatty acid-supplemented and unsupplemented AR42J cells had similar growth patterns and degrees of differentiation. Our data in AR42J cells also indicate that the fatty acid delivery system, which was chosen to mimic physiological conditions and to avoid damaging effects of free fatty acids or solvents, is very effective in modifying membrane fatty acids in this cell model, since extensive changes were produced in 72-hr exposure. Moreover, the concentration of added fatty acids in the culture medium (50  $\mu\text{M}$ ) was selected to approximate physiological concentrations. The total plasma free fatty acid concentration in the fed state is approximately 0.3 mM, so concentrations of individual fatty acids are expected to be in the range of 30–130  $\mu\text{M}$  (32).

Until now, no study has existed about the influence of changes in the extracellular lipid composition on membrane fatty acid profile of AR42J cells. Our results show that this cell line is very responsive to such changes and this has a first obvious implication. Given that the fatty acid composition of different kinds of commercially available serum differs widely (33), the fact that the membrane profile is likely to change should be taken into account when changes are contemplated in the serum used to grow AR42J pancreatic cells.

In the current study, the addition of 18:1 n-9 or 18:2 n-6 to the culture medium for 72 hrs profoundly influenced the fatty acid composition of AR42J cell membranes. Importantly, despite some differences in magnitude, the pattern and direction of changes was parallel to that found in rats fed virgin olive oil or sunflower oil (best illustrated in Figs. 3 and 4). For example, compared with baseline situation (C rats and AR42J-C cells) both virgin olive oil in rats and 18:1 n-9 in cells evoked a significant increase in membrane MUFA (due to 18:1 n-9) at the expense of SFA and PUFA. We also observed that both sunflower oil in rats and 18:2 n-6 in AR42J cells produced significant increases in total and n-6 PUFA at the expense of SFA and MUFA. Variations in the other fatty acid indices, including the SFA/UFA ratio, followed the same trend after feeding oils *in vivo* or growing the cells with the respective major fatty acid.

There is only one remarkable difference between rat

pancreas and AR42J cells in their ability to adapt to environmental fatty acids and it concerns 20:4 n-6. The enrichment of standard serum with 18:2 n-6 did not produce the expected increase in the 20:4 n-6 content of AR42J phospholipids. It is unknown whether the failure of these cells to accumulate 20:4 n-6 under our experimental conditions is due to an intrinsic inability of the cell to store an increased amount of 20:4 or, more likely, if these cells express a low desaturase activity, as shown by some continuously cultured cell lines (34, 35). Not only 20:4 n-6 did not increase, but it actually decreased in AR42J-L cells compared with those cultured with standard serum. Two factors may be responsible for this decrease and both could operate concurrently. One is that the cell has a limited capacity to convert 18:2 n-6 to 20:4 n-6. The other is that the incorporation of 20:4 n-6 into membrane phospholipids is reduced as the availability of 18:2 n-6 increases, presumably through competitive inhibition. Studies are being conducted in our laboratory to make clear this fundamental point. Preliminary results of time-course experiments<sup>1</sup> show that the membrane levels of 20:4 n-6 in AR42J cells are similarly low regardless of whether 18:2 n-6 is added to the medium for 72 hrs or 144 hrs. Nevertheless, the results of the present work indicate that this characteristic of AR42J cells should be taken into account, especially when using this line as a cellular model for pancreatitis studies, given the role of 20:4 n-6 in eicosanoid synthesis.

To summarize, the present work reveals the existence of significant differences between the membrane fatty acid profile of AR42J cells cultured with intact fetal calf serum and that of pancreas from rats fed a standard chow for this species. Supplementation of culture media with 18:1 n-9 or 18:2 n-6 changed in 72 hrs the fatty acid spectrum of AR42J cells and, despite some differences in magnitude, the pattern and direction of changes was parallel to that found in rats fed diets enriched in virgin olive oil or sunflower oil. A largely different content in 20:4 n-6 observed in membranes from rat pancreas and AR42J cells upon enrichment of diet and culture medium, respectively, with 18:2 n-6 might account for the role played by the liver in the rat.

Overall, our results suggest that the AR42J cell line can be a useful tool to assess the effects of specific membrane compositional changes on acinar cell function and signaling. However, because of differences in baseline characteristics, and perhaps fatty acid metabolism, we believe that *in vitro* work with this cell line is no substitute for *in vivo* studies. Thus, although research with AR42J cells can possibly save time, money and, more importantly, animals, we encourage other scientists to confirm results obtained in AR42J cells with experiments *in vivo*, because there can be no doubt that the whole animal is the "gold standard" to corroborate the events described at the cellular level.

We thank the Junta de Andalucía for personal support of N. Audi and M. D. Yago, and the University of Granada for personal support of M. D. Mesa and M. A. Martínez.

- Clandinin MT, Cheema S, Field CJ, Garg ML, Venkatraman J, Clandinin TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J* 5:2761–2769, 1991.
- Vajreswari A, Narayanareddy K. Effect of dietary fats on some membrane-bound enzyme activities, membrane lipid composition and fatty acid profiles of rat heart sarcolemma. *Lipids* 27:339–343, 1992.
- Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J. Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat. *J Bioenerg Biomembr* 33:127–134, 2001.
- Chapkin RS, Hong MY, Fan YY, Davidson LA, Sanders LM, Henderson CE, Barhoumi R, Burghardt RC, Turner ND, Lupton JR. Dietary n-3 PUFA alter colonocyte mitochondrial membrane composition and function. *Lipids* 37:193–199, 2002.
- Yago MD, Diaz RJ, Ramirez R, Martinez MA, Mañas M, Martinez-Victoria E. Dietary-induced changes in the fatty acid profile of rat pancreatic membranes are associated with modifications in acinar cell function and signalling. *Br J Nutr* 91:227–234, 2004.
- Martinez MA, Yago MD, Lajas AI, Pariente JA, Martinez-Victoria E, Mañas M. Dietary fatty acids modify membrane lipid composition in rabbits with experimental atherosclerosis. Is this fact involved in the enzymatic secretion pattern? *J Physiol* 548:3P–4P, 2003.
- Martinez MA, Lajas AI, Yago MD, Redondo PC, Granados MP, Gonzalez A, Rosado JA, Martinez-Victoria E, Mañas M, Pariente JA. Dietary virgin olive oil enhances secretagogue-evoked signalling in rat pancreatic acinar cells. *Nutrition* 20:536–541, 2004.
- Diaz RJ, Yago MD, Martinez-Victoria E, Naranjo JA, Martinez MA, Mañas M. Comparison of the effects of dietary sunflower oil and virgin olive oil on rat exocrine pancreatic secretion *in vivo*. *Lipids* 38:1119–1126, 2003.
- Yago MD, Diaz RJ, Martinez MA, Audi N, Naranjo JA, Martinez-Victoria E, Mañas M. Effects of the type of dietary fat on acetylcholine-evoked amylase secretion and calcium mobilization in isolated rat pancreatic acinar cells. *J Nutr Biochem* 17:242–249, 2006.
- Dietrich JB. AR4-2J cells: a model to study polypeptide hormone receptors. *Biosci Rep* 16:273–288, 1996.
- Simeone DM, Yule DI, Logsdon CD, Williams JA. Ca<sup>2+</sup> signalling through secretagogue and growth factor receptors on pancreatic AR42J cells. *Regul Pept* 55:197–206, 1995.
- Feick P, Gilhaus S, Blum R, Hofmann F, Just I, Schulz I. Inhibition of amylase secretion from differentiated AR4-2J pancreatic acinar cells by an actin cytoskeleton controlled protein tyrosine phosphatase activity. *FEBS Lett* 451:269–274, 1999.
- Bozem M, Kuhlmann S, Blum R, Feick P, Schulz I. Hormone-stimulated calcium release is inhibited by cytoskeleton-disrupting toxins in AR4-2J cells. *Cell Calcium* 28:73–82, 2000.
- Hsu S, Schmid A, Sternfeld L, Anderie I, Solis G, Hofer HW, Schulz I. Tyrosine phosphatase PTP1B modulates store-operated calcium influx. *Cell Signal* 15:1149–1156, 2003.
- Ikeda Y, Fukuoka S. Phosphatidic acid production, required for cholecystokinin octapeptide-stimulated amylase secretion from pancreatic acinar AR42J cells, is regulated by a wortmannin-sensitive process. *Biochem Biophys Res Commun* 306:943–947, 2003.
- Song JY, Lim JW, Kim H, Morio T, Kim KH. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. *J Biol Chem* 278:36676–36687, 2003.
- Satoh A, Gukovskaya AS, Edderkaoui M, Daghighian MS, Reeve JR Jr, Shimosegawa T, Pandolfi SJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates pancreatitis responses in acinar cells via protein kinase C and proline-rich tyrosine kinase 2. *Gastroenterology* 129:639–651, 2005.

<sup>1</sup>N. Audi, unpublished data, 2006.

18. Yu JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. NADPH oxidase mediates interleukin-6 expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1458–1469, 2005.
19. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123:1939–1951, 1993.
20. Chow SC, Sisfontes L, Jondal M, Bjorkhem I. Modification of membrane phospholipid fatty acyl composition in a leukemic T cell line: effects on receptor mediated intracellular  $Ca^{2+}$  increase. *Biochim Biophys Acta* 1092:358–366, 1991.
21. Ferreira L, Perez-Gonzalez N, Llanillo M, Calvo JJ, Sanchez-Bernal C. Acute pancreatitis decreases pancreas phospholipid levels and increases susceptibility to lipid peroxidation in rat pancreas. *Lipids* 37:167–171, 2002.
22. Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27:114–120, 1986.
23. Renau J, Megias L. Manual de técnicas de microscopía electrónica (M.E.T.). Aplicaciones biológicas. Granada, Spain: Editorial Universidad de Granada, 1998.
24. Martinez-Burgos MA, Granados MP, Gonzalez A, Rosado JA, Yago MD, Salido GM, Martinez-Victoria E, Mañas M, Pariente JA. Involvement of ryanodine-operated channels in tert-butylhydroperoxide-evoked  $Ca^{2+}$  mobilisation in pancreatic acinar cells. *J Exp Biol* 209:2156–2164, 2006.
25. Spector AA, Mathur SN, Kaduce TL, Hyman BT. Lipid nutrition and metabolism of cultured mammalian cells. *Prog Lipid Res* 19:155–186, 1980.
26. Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mañas M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 24:511–521, 1998.
27. Soriguer FJ, Tinahones FJ, Monzon A, Pareja A, Rojo-Martinez G, Moreno F, Esteva I, Gomez-Zumaquero JM. Varying incorporation of fatty acids into phospholipids from muscle, adipose and pancreatic exocrine tissues and thymocytes in adult rats fed with diets rich in different fatty acids. *Eur J Epidemiol* 16:585–594, 2000.
28. Thewke D, Kramer M, Sinensky MS. Transcriptional homeostatic control of membrane lipid composition. *Biochem Biophys Res Commun* 273:1–4, 2000.
29. Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 40:1549–1558, 1999.
30. Ding S, Mersmann HJ. Fatty acids modulate porcine adipocyte differentiation and transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic proteins. *J Nutr Biochem* 12:101–108, 2001.
31. Mishra R, Simonson MS. Saturated free fatty acids and apoptosis in microvascular mesangial cells: palmitate activates pro-apoptotic signaling involving caspase 9 and mitochondrial release of endonuclease G. *Cardiovasc Diabetol* 4:2, 2005.
32. Calder PC, Bond JA, Harvey DJ, Gordon S, Newsholme EA. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochem J* 269:807–814, 1990.
33. Stoll LL, Spector AA. Changes in serum influence the fatty acid composition of established cell lines. *In Vitro* 20:732–738, 1984.
34. Yoo TJ, Chiu HC, Spector AA, Whiteaker RS, Denning GM, Lee NF. Effect of fatty acid modifications of cultured hepatoma cells on susceptibility to complement-mediated cytolysis. *Cancer Res* 40:1084–1090, 1980.
35. Kaduce TL, Spector AA, Bar RS. Linoleic acid metabolism and prostaglandin production by cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *Arteriosclerosis* 2:380–389, 1982.



University of Granada

# Differentiation Of AR42J Cells: Effects On Adaptation Of Membrane Lipidic Profile And Amylase Secretion

N. Audi\*, M.D. Mesa#, M.A. Martínez\*, E. Martínez-Victoria\*, M. Mañas\* and  
M.D. Yago\*

\*Department of Physiology. #Department of Biochemistry and Molecular Biology.

Institute of Nutrition and Food Technology. C/Ramón y Cajal 4, 18071 University of Granada. Granada, Spain



Institute of Nutrition  
and Food Technology

**Introduction:** The pancreatic tumoral cell line AR42J is an in vitro model of exocrine pancreas but its exocrine function is abnormal. Some authors perform studies in AR42J cells treated with dexamethasone (DX), that favours their differentiation towards exocrine phenotype. It exists controversy over the effects of dexamethasone on membrane fatty acid (FA) profile. We confirmed that dietary fat influences FA composition of rat pancreatic membranes and this affects acinar cell function (Yago *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2004). We also demonstrated that AR42J cells adapt their membranes after exposure to different FA in the medium (Audi *et al.*, 2007).

**Aim:** To investigate if dexamethasone changes the adaptation of FA profile of cell membranes exposed to different FA and if dexamethasone affects the functional adaptation to different FA added.

**Materials and Methods:** AR42J cells were incubated for 72 h in presence (+DX) or absence (-DX) of dexamethasone in medium enriched with 18:1n-9 (O) or with 18:2n-6 (L). FA analysis was performed by gas-liquid chromatography (Audi *et al.*, 2007). Amylase activity in supernatant fractions was determined by a modification of Bernfeld's method after incubation at 37°C for 50 min with different concentrations of CCK-8.

**Results and Discussion:** Enrichment of medium with the FA profoundly influenced the membrane FA composition of differentiated and undifferentiated AR42J cells (Table 1). The adaptation process is more dependent on the FA added than on the DX because there are changes on MUFA levels but there are no modifications on n-6 PUFA levels in differentiated vs. undifferentiated cells (Fig.1). The response pattern of amylase secretion with various doses of CCK-8 was higher in differentiated cells than in undifferentiated cells, although this effect of DX was more significant in n-6 PUFA enriched membranes (Fig. 3) than in membranes enriched with MUFA (Fig. 2). Functionality depends on both factors, because in -DX cells there is no different amylase response presumably because there are few zymogen granules. That is, to see effects of change in FA profile is indispensable the treatment with DX.

FA index	O+DX	L+DX	O-DX	L-DX
MUFA	37.5 ± 0.97 <sup>a</sup>	20.9 ± 0.26	33.0 ± 0.47 <sup>b</sup>	18.5 ± 0.16
PUFA n-6	5.1 ± 0.13 <sup>a</sup>	21.6 ± 0.28	4.6 ± 0.15 <sup>b</sup>	21.3 ± 0.32
18:1 n-9	32.4 ± 1.11 <sup>a</sup>	16.0 ± 0.22	29.4 ± 0.59 <sup>b</sup>	15.5 ± 0.12
18:2 n-6	2.4 ± 0.03 <sup>a</sup>	17.0 ± 0.21	2.2 ± 0.10 <sup>b</sup>	13.2 ± 0.50

Table 1. Fatty acids and indices of AR42J crude membranes. MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids. Fatty acid indices are expressed as percentages of total fatty acid content. Values are means ± SEM. O+DX: n = 15; O-DX: n = 8; L+DX: n = 15; L-DX: n = 8. <sup>a</sup>O+DX vs. L+DX ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup>O-DX vs. L-DX ( $p < 0.05$ ).

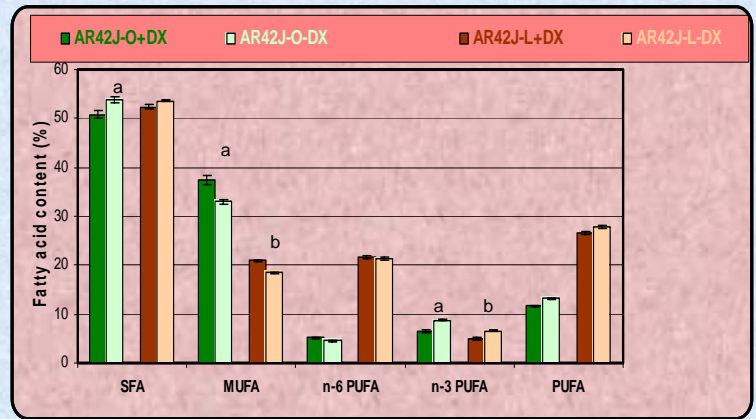


Figure 1. Fatty acid profile of crude membranes from differentiated (+DX) or not differentiated (-DX) AR42J cells cultured for 72 hrs in medium containing serum enriched in 18:1 n-9 (O) or serum enriched in 18:2 n-6 (L). SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids. Fatty acid indices are expressed as percentages of total fatty acid content. Values are means ± SEM. O+DX: n = 15; O-DX: n = 8; L+DX: n = 15; L-DX: n = 8. For a given index, letters above the bars denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between differentiated and not differentiated cells.

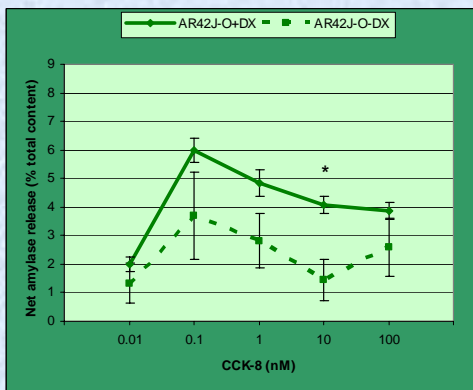


Figure 2. Net amylase release (increase above basal), of cells cultured in medium enriched with 18:1 n-9, evoked by different doses of CCK-8. Values are means ± SEM (n = 16). Asterisk represents statistically significant differences between the groups (Student's t-test,  $p < 0.05$ ).

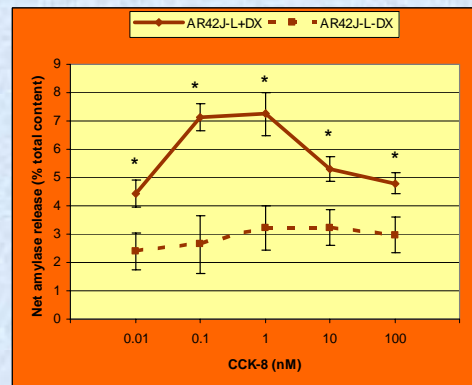


Figure 3. Net amylase release (increase above basal), of cells cultured in medium enriched with 18:2 n-6, evoked by different doses of CCK-8. Values are means ± SEM (n = 16). Asterisks represent statistically significant differences between the groups (Student's t-test,  $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Results indicate that differentiation with DX is essential for study the changes that the membrane FA profile cause on the cellular function.

**Acknowledgment:** Supported by MEC (BFI2002-02772, AGL-2006-05005).

## References:

Yago *et al.* J Nutr Biochem (2006) 17:242-9.  
Martinez *et al.* Nutrition (2004) 20:536-41.  
Audi *et al.* Exp Biol Med (2007) 232:532-41.





P2

## Interleukin-6 effects on amylase secretion and calcium signalling in pancreatic AR42J cells: modulation by membrane fatty acid composition

N AUDI<sup>1</sup>, MA MARTÍNEZ<sup>1</sup>, MD MESA<sup>2</sup>, E MARTÍNEZ-VICTORIA<sup>1</sup>, M MAÑAS<sup>1</sup> and MD YAGO<sup>1</sup>

*Institute of Nutrition and Food Technology, Department of Physiology<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology<sup>2</sup>, University of Granada, Spain*

### Introduction

Oleic acid is a typical component of the Mediterranean diet. The type of dietary fat strongly influences the fatty acid (FA) composition of rat pancreatic cell membranes and this is associated with changes in the functionality of viable pancreatic acini<sup>1,2</sup>. AR42J cell line is a useful tool to assess the effect of membrane compositional changes on acinar cell function<sup>3</sup>.

### Design and methods

Membrane FA modifications in AR42J cells were evoked as it was previously described by us<sup>3</sup>. Amylase activity was determined and expressed as a percentage of total amylase content at the beginning that was released into the extracellular medium during the incubation. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration (expressed as F340/F380) was determined in fura-2-loaded cells by ratiometric epifluorescence microscopy. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare amylase secretion and Ca<sup>2+</sup> values between groups treated with or without IL-6.

### Conclusions

Membrane fatty acid profile modulates the effects of IL-6 on AR42J cell function assessed in terms of CCK-8-stimulated amylase release. This is not associated with differences in Ca<sup>2+</sup> peaks evoked by CCK-8, at least, when a concentration of 1 nM is used. Experiments are in progress in order to elucidate if any of these dietary fats can have a beneficial effect on pancreatic inflammatory processes.

### References

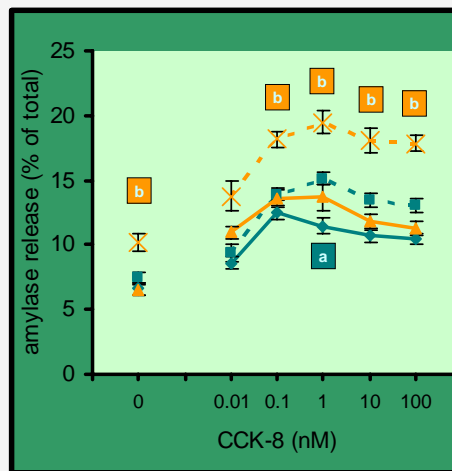
- Martinez MA *et al.* (2004) *Nutrition* **20**, 536–541.
- Yago MD *et al.* (2004) *Br J Nutr* **9**, 1227–234.
- Audi N *et al.* (2007) *Exp Biol Med* **232**, 532-41.

### Aim

Our aim was to study the effects of chronic treatment with IL-6 on amylase secretion and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in AR42J cells, and to elucidate if these effects are influenced by different membrane FA composition.

### Results

With regard to basal and stimulated amylase secretion, cells with membranes enriched in oleic acid are not affected by IL-6, while those enriched in linoleic acid are more sensitive to the effects of this inflammatory factor. On the other hand, dietary fat and IL-6 did not influence Ca<sup>2+</sup> peaks evoked by 1 nM CCK-8.

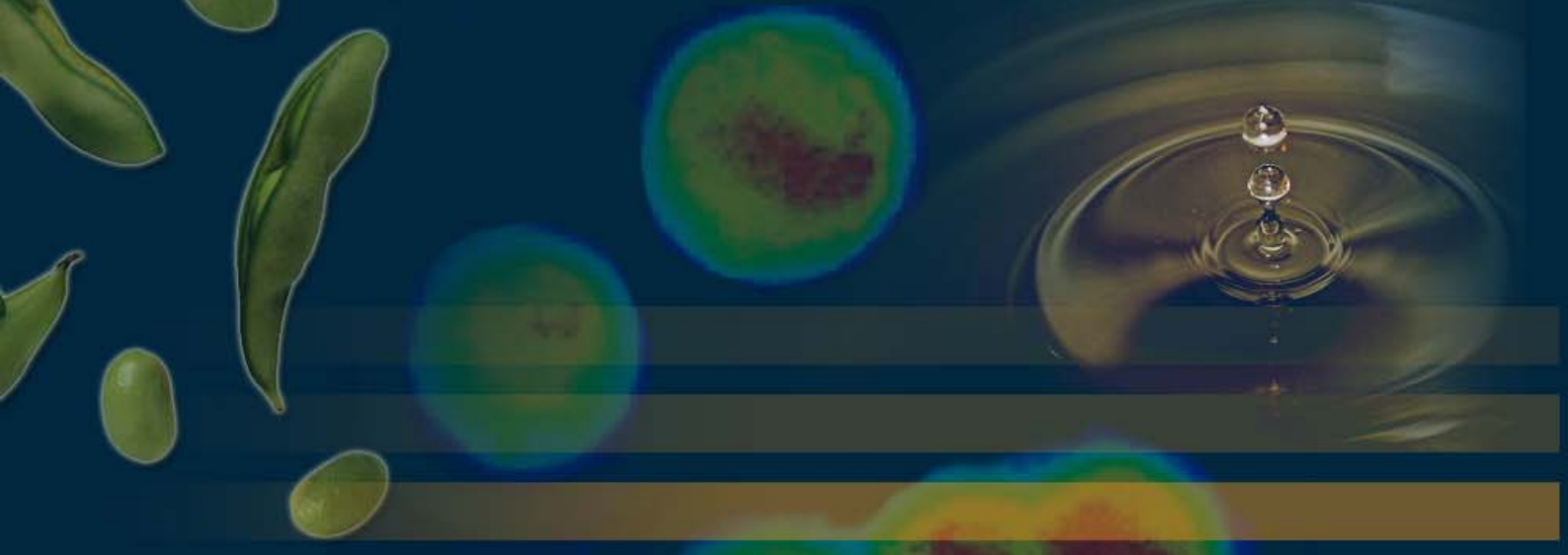


Amylase release evoked by different concentrations of cholecystokinin octapeptide (CCK-8). Values are means  $\pm$  SE (n=16 for all groups). a:  $P < 0.05$  between oleic group and oleic+IL-6 group. b:  $P < 0.05$  between linoleic group and linoleic+IL-6 group.

	Ca <sup>2+</sup> peaks (340/380 intensity ratio)		Ca <sup>2+</sup> decay constants (s <sup>-1</sup> )	
	Means	SE	Means	SE
oleic (n = 44)	2.2070	0.0861	0.0034 <sup>a</sup>	0.0002
oleic+IL-6 (n = 39)	2.1297	0.1037	0.0028	0.0002
linoleic (n = 42)	2.1930	0.1112	0.0029	0.0003
linoleic+IL-6 (n = 29)	2.1457	0.0978	0.0032	0.0002

Cytosolic Ca<sup>2+</sup> response evoked by CCK-8 (1 nM) perfusion of AR42J cells with different membrane fatty acid profile treated for 48 h with IL-6 or vehicle. n is the number of cells employed. <sup>a</sup>  $P < 0.05$  between oleic group and oleic+IL-6.





Departamento de Fisiología  
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos  
Universidad de Granada