

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Fisiología

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”



**RESPUESTAS CELULARES A MODIFICACIONES EN EL  
PERFIL LIPÍDICO DE MEMBRANA Y A LA PRESENCIA  
DE UN ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE OLIVA EN UN  
MODELO *IN VITRO* DE PANCREATITIS. ASPECTOS  
INFLAMATORIOS**

Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de  
Granada presentada por:

**María Belén López Millán**

Bajo la dirección de los doctores:

Mariano Mañas Almendros

María Dolores Yago Torregrosa

María Dolores Mesa García

Granada, 2011.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Belén López Millán  
D.L.: GR 487-2012  
ISBN: 978-84-694-6934-7



D. Mariano Mañas Almendros, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

Dña. María Dolores Yago Torregrosa, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

Dña. María Dolores Mesa García, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Informan:

Que el trabajo titulado “RESPUESTAS CELULARES A MODIFICACIONES EN EL PERFIL LIPÍDICO DE MEMBRANA Y A LA PRESENCIA DE UN ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE OLIVA EN UN MODELO *IN VITRO* DE PANCREATITIS. ASPECTOS INFLAMATORIOS” ha sido realizado por María Belén López Millán bajo su dirección, y que reúne todos los requisitos para ser defendido y optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, se firma este certificado en Granada el 20 de junio de 2011

Dr. Mariano Mañas Almendros

Dra. María Dolores Yago Torregrosa

Dra. María Dolores Mesa García



Dña. María López-Jurado Romero de la Cruz, Catedrática y Directora del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

Certifica:

Que el trabajo titulado “RESPUESTAS CELULARES A MODIFICACIONES EN EL PERFIL LIPÍDICO DE MEMBRANA Y A LA PRESENCIA DE UN ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE OLIVA EN UN MODELO *IN VITRO* DE PANCREATITIS. ASPECTOS INFLAMATORIOS” ha sido realizado por María Belén López Millán en las instalaciones del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, donde están ubicados los laboratorios del grupo de investigación AGR-260 Alimentación, Nutrición y Salud , perteneciente a este Departamento.

Y para que conste donde proceda, se firma este certificado en Granada el 20 de junio de 2011

Dra. María López-Jurado Romero de la Cruz.



El trabajo de investigación recogido en esta Memoria de Tesis Doctoral titulada “RESPUESTAS CELULARES A MODIFICACIONES EN EL PERFIL LIPÍDICO DE LA MEMBRANA Y A LA PRESENCIA DE UN ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE OLIVA EN UN MODELO *IN VITRO* DE PANCREATITIS. ASPECTOS INFLAMATORIOS” se engloba en el marco del Proyecto de Investigación AGL2006-05005/ALI, financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia. La aspirante al grado de Doctora ha sido becaria del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.





## **PUBLICACIONES DE LA ASPIRANTE AL GRADO DE DOCTORA**

- Carola V. Santana, María B. López, María A. Martínez-Burgos, Mariano Mañas, María D. Yago (2009) Influence of dietary lipid composition on the pancreatic lipid profile. *AgroFOOD industry hi-tech* **20**: 48-51.
- Martínez Burgos MA, Martínez-Victoria I, Milá R, Farrán A, Farré R, Ros G, Yago MD, Audi N, Santana C, López Millán MB, Ramos López S, Mañas M and Martínez-Victoria E (2009) Building a unified Spanish food database according to EuroFIR specifications. *Food Chemistry* **113**: 784-788.

## **APORTACIONES A CONGRESOS NACIONALES**

- López-Millán María Belén, Santana Carola, Martínez-Burgos María Alba, Gutiérrez-Ríos P, Audi N, Mañas Mariano, Yago María Dolores, Martínez de Victoria Emilio. Cambios en la concentración de calcio citosólico ( $[Ca^{2+}]_c$ ) en células AR42J. Influencia del tipo de membrana y de un antioxidante del aceite de oliva. XXIX CONGRESO INTERNACIONAL (SOCIEDAD FARMACÉUTICA DEL MEDITERRÁNEO LATINO). Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Del 15 al 18 de septiembre de 2010. Comunicación Póster. Libro de abstracts.

## **APORTACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES**

- Martínez Burgos MA, Mila R, Farran A, Ros G, Yago MD, Audi N, Lopez Millán MB, Ramos Lopez S, Mañas M and Martínez-Victoria E. Building and indexing the foods of the Spanish composition database in EuroFIR. 2nd International EuroFIR Congreso (Red Europea de Excelencia EuroFIR). Granada, España. Del 26 al 27 de septiembre de 2007. Comunicación Póster. Libro de abstracts. P. 53-54.

- López-Millán M.B., Santana C., Audi N., Martínez-Burgos M.A., Mesa M.D., Martínez-Victoria E., Mañas M., Yago M.D. Modification of membrane fatty acid composition of pancreatic AR42J cells influences bile acid-induced  $Ca^{2+}$  responses. XXXV Congreso SECF (Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF)). Valencia, España. Del 17 al 20 de febrero de 2009. Comunicación Póster. Libro de abstracts. P. 154-155.
- Audi N., Mesa M.D., Santana C., López-Millán M.B., Martínez-Burgos M.A., Mañas M., Martínez-Victoria E., Yago M.D. Adaptation of membrane lipid profile and amylase secretion of AR42J cells to fatty acids in culture medium: influence of exposure period. XXXV Congreso SECF (Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF)). Valencia, España. Del 17 al 20 de febrero de 2009. Comunicación Póster. Libro de abstracts. P. 154.
- M.A. Martínez-Burgos, I. Martínez de Victori, C. Santana, M.B. López-Millán, N. Audi, M.D. Yago, G. Ros, M. Mañas, E. Martínez de Victoria. The process of food compilation in the context of the Spanish food information resource. 3rd International EuroFir Congress (ORGANIZA: NoE EUROFIR - FP6). Viena, Austria. Del 9 al 10 de septiembre de 2009. Comunicación Póster. Libro de abstracts. P. 162-163.
- C. Santana, M.B. López-Millán, M. A. Martínez-Burgos, M. Mañas, E. Martínez-Victoria and M. D. Yago. Influence of membrane fatty acid composition on cell viability and lipid peroxidation in a cell model (AR42J) of cerulein-induced acute pancreatitis. 3rd International Immunonutrition Workshop (The Nutrition Society). Gerona, España. Del 21 al 24 de octubre de 2009. Comunicación Póster. Libro de abstracts. P. 69-70.

# **A**BREVIATURAS



<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>:</b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> citosólico
<b>AA:</b>	Ácido araquidónico ( <i>arachidonic acid</i> )
<b>ACh:</b>	Acetilcolina ( <i>acetylcholine</i> )
<b>ADN:</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ADPRc:</b>	ADPribosa cíclica
<b>AMPc:</b>	Adenosina monofosfato cíclica
<b>AR42J:</b>	Línea celular de pancreatoma de rata ( <i>rat pancreatoma cell line</i> )
<b>ARNm:</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATPasa:</b>	Adenosina trifosfatasa
<b>BSA:</b>	Albúmina sérica bovina ( <i>bovine serum albumin</i> )
<b>CCK:</b>	Colecistoquinina ( <i>cholecystokinin</i> )
<b>CCK-8:</b>	Colecistoquinina-octapéptido ( <i>cholecystokinin-octapeptide</i> )
<b>COX:</b>	Ciclooxigenasa
<b>DAG:</b>	Diacilglicerol
<b>DHA:</b>	Ácido docosahexaenoico ( <i>docosahexanoic acid</i> )
<b>DX:</b>	Dexametasona
<b>EPA:</b>	Ácido eicosapentaenoico ( <i>eicosapentaenoic acid</i> )
<b>ERO:</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FCS:</b>	Suero fetal bovino ( <i>fetal calf serum</i> )
<b>GDP:</b>	Guanosina difosfato
<b>GMPc:</b>	Guanosina monofosfato cíclica
<b>IL-1:</b>	Interleucina-1
<b>IL-10:</b>	Interleucina-10
<b>IL-6:</b>	Interleucina-6
<b>IP<sub>3</sub>:</b>	Inositol 1,4,5-trisfosfato
<b>IP<sub>3</sub>R:</b>	Receptores de IP <sub>3</sub>
<b>LOX:</b>	Lipoxigenasa
<b>MUFA:</b>	Ácidos grasos monoinsaturados ( <i>monounsaturated fatty acids</i> )
<b>NAADP:</b>	Acido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato
<b>NADH:</b>	Forma reducida del Nicotín-adenín dinucleótido
<b>NADPH:</b>	Nicotín-adenín dinucleótido fosfato
<b>NF-κB:</b>	Factor nuclear kappa B
<b>PBS:</b>	Solución salina tamponada con fosfatos ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PIP<sub>2</sub>:</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

<b>PKC:</b>	Proteína cinasa C
<b>PLA<sub>2</sub>:</b>	Fosfolipasa A2
<b>PLC:</b>	Fosfolipasa C
<b>PMCA:</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPasa asociada a membrana plasmática
<b>PP:</b>	Polipéptido pancreático
<b>PPAR:</b>	Receptor activado por el proliferador de los peroxisomas ( <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i> )
<b>PUFA:</b>	Ácidos grasos poliinsaturados ( <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
<b>PYY:</b>	Péptido tirosina-tirosina
<b>RE:</b>	Retículo endoplasmático
<b>SERCA:</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATP-asa de retículo sarco/endoplásmico
<b>SFA:</b>	Ácidos grasos saturados ( <i>saturated fatty acids</i> )
<b>TNF<math>\alpha</math>:</b>	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor-alpha</i> )
<b>UFA:</b>	Ácidos grasos insaturados ( <i>unsaturated fatty acids</i> )
<b>UI:</b>	Índice de insaturación ( <i>unsaturation index</i> )

# **ÍNDICE**





JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	27
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	33
Páncreas. Aspectos generales.....	33
Páncreas Exocrino.....	36
Acino pancreático.....	36
Célula acinar.....	37
Células centroacinares.....	39
Sistema ductular.....	39
Enzimas Pancreáticas Digestivas.....	39
Amilasa Pancreática.....	40
Síntesis y Secreción de enzimas digestivas.....	41
Regulación de la Secreción Pancreática Exocrina.....	43
Regulación Nerviosa.....	44
Regulación colinérgica.....	44
Regulación adrenérgica.....	45
Regulación peptidérgica.....	45
Regulación Hormonal.....	46
Secretina.....	46
CCK.....	47
Hormonas inhibitoras.....	48
Mecanismos de Acoplamiento Estímulo-Secreción en la célula acinar.....	49
Receptores de membrana.....	49
Mecanismo de transducción de la señal.....	50
El Calcio como Mensajero intracelular ( $Ca^{2+}$ ).....	53
Mecanismos que mantienen la concentración basal de $Ca^{2+}$ citosólico.....	55
Mecanismos que aumentan la concentración de calcio citosólico ( $[Ca^{2+}]_c$ ).....	56
Oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ .....	58
Señalización espacio-temporal.....	60
$Ca^{2+}$ y Mitocondria.....	60
Línea celular AR42J.....	62

Pancreatitis Aguda .....	64
Modelo Experimental de Pancreatitis Aguda inducida por Ceruleína .....	65
Aspectos más relevantes de la patogénesis del modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína.....	66
Bloqueo de la secreción .....	67
Activación intracelular de zimógenos.....	67
Aumentos patológicos en las concentraciones de calcio citosólico .....	68
Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).....	69
Activación del factor de transcripción NF-κB .....	69
Muerte celular: necrosis versus apoptosis.....	71
Inflamación y Pancreatitis Aguda.....	72
Mediadores Inflamatorios .....	73
Interleucina-1β .....	73
Factor de Necrosis Tumoral- α .....	74
Interleucina-6 .....	75
Interleucina-10 .....	75
Factor Nuclear-κB.....	76
Mecanismos de Muerte Celular en la Pancreatitis Aguda .....	78
Apoptosis.....	79
Vía extrínseca .....	81
Vía intrínseca.....	81
Necrosis .....	84
Relación apoptosis-necrosis en la pancreatitis aguda.....	85
Dieta Mediterránea .....	86
Ácido Grasos Monoinsaturados.....	89
Hidroxitirosol.....	90
Ácidos Grasos Poliinsaturados Omega-3 .....	91
Ácidos grasos e inflamación.....	93
Efecto de los ácidos grasos de la dieta sobre el Perfil Lipídico de la membrana celular..	95
Adaptabilidad del acino pancreático .....	97

Adaptabilidad de la línea celular AR42J .....	99
MATERIALES Y MÉTODOS.....	103
Diseño Experimental .....	103
Cultivo Celular .....	103
Grupos Experimentales .....	103
Modificación del Perfil Lipídico .....	105
Diseño del Modelo .....	106
Determinación del Perfil Lipídico de Membrana.....	108
Aislamiento de las Membranas .....	108
Reactivos.....	108
Procedimiento.....	108
Extracción Lipídica y Transesterificación De Ácidos Grasos.....	109
Reactivos.....	109
Procedimiento.....	109
Determinación de la Concentración de Ca <sup>2+</sup> citosólico.....	112
Reactivos.....	113
Procedimiento .....	113
Determinación de la Secreción de Amilasa.....	115
Incubación de las células AR42J con CCK-8.....	115
Reactivos.....	115
Procedimiento.....	116
Determinación de la actividad amilásica.....	118
Reactivos.....	118
Procedimiento.....	118
Determinación de producción de Mediadores Inflamatorios (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ ).....	121
Reactivos.....	123
Procedimiento .....	123
Determinación de la activación del Factor Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).....	125

Extracción de Proteínas.....	126
Reactivos.....	126
Procedimiento.....	126
Cuantificación De Proteínas .....	127
Reactivos.....	127
Procedimiento.....	127
Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE) .....	128
Reactivos.....	129
Procedimiento.....	130
Transferencia.....	133
Reactivos.....	133
Procedimiento.....	133
Detección Inmunológica .....	135
Reactivos.....	135
Procedimiento.....	136
Cuantificación del p65 .....	136
Reactivos.....	138
Procedimiento.....	138
Ensayo Apoptosis/Necrosis .....	139
Reactivos.....	140
Procedimiento.....	140
Ensayo MTT.....	141
Reactivos.....	141
Procedimiento .....	142
Material Empleado.....	142
Tratamiento Estadístico de los resultados.....	145
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>149</b>
Determinación del Perfil Lipídico de membrana en células AR42J diferenciadas.....	149
Respuesta Inflamatoria.....	154
Activación del NF $\kappa$ B .....	154

I $\kappa$ B $\alpha$ .....	154
p65 .....	158
Correlación I $\kappa$ B $\alpha$ -p65 .....	160
Producción de mediadores inflamatorios (IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ ).....	161
Mecanismos de Muerte Celular.....	167
Ensayo apoptosis/necrosis mediante Citometría de Flujo.....	167
Células intactas .....	170
Apoptosis.....	173
Necrosis .....	175
Relación apoptosis/necrosis .....	177
MTT.....	178
Funcionalidad Celular.....	182
Determinación de la concentración de Ca <sup>2+</sup> citosólico.....	182
Concentraciones basales de calcio citosólico .....	185
Evolución temporal de la concentración citosólica de calcio tras la estimulación con CCK-8.....	188
Incremento del Pico.....	188
Área Bajo la Curva .....	190
Relación IP/ABC .....	191
Secreción de Amilasa.....	192
Secreción basal de amilasa.....	192
Secreción de amilasa neta estimulada por CCK-8 .....	195
DISCUSIÓN .....	203
Modificación del Perfil de ácidos grasos de las membranas de las células AR42J .....	206
Modelo de Pancreatitis Aguda en células AR42J diferenciadas .....	211
Efecto de la ceruleína.....	211
Respuesta inflamatoria.....	211
Activación del NF- $\kappa$ B.....	211
Producción de mediadores inflamatorios (IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ ) .....	213
Mecanismos de muerte celular .....	216
Apoptosis/Necrosis.....	216
MTT .....	218

Funcionalidad celular .....	219
Concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_c$ ).....	219
Amilasa.....	224
Efecto del HT .....	228
Marcadores inflamatorios.....	228
Muerte celular.....	228
Apoptosis/Necrosis.....	228
MTT .....	230
Funcionalidad celular .....	230
Concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_c$ ).....	230
Amilasa.....	232
Efecto del HT en el tratamiento con Ceruleina.....	234
Respuesta inflamatoria.....	234
Muerte celular.....	235
Apoptosis/necrosis .....	235
MTT .....	235
Funcionalidad celular .....	236
Concentración citosólica de calcio.....	236
Secreción de Amilasa .....	238
Modelo de Pancreatitis Aguda en células AR42J diferenciadas con membranas modificadas enriquecidas en ácido oleico.....	239
Efecto del ácido graso.....	239
Respuesta inflamatoria.....	239
Mecanismos de muerte celular .....	239
Funcionalidad celular .....	241
Concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_c$ ).....	241
Amilasa.....	242
Efecto de la ceruleína.....	243
Respuesta inflamatoria.....	243
Mecanismo de muerte celular .....	245
Apoptosis/Necrosis.....	245
MTT .....	246
Funcionalidad celular .....	247

Concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_c$ ).....	247
Amilasa.....	249
Efecto del HT .....	250
Respuesta inflamatoria.....	250
Mecanismo de muerte celular .....	251
Funcionalidad celular .....	253
Concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_c$ ).....	253
Amilasa.....	254
Efecto del HT en el tratamiento con Ceruleina.....	255
Respuesta inflamatoria.....	255
Mecanismos de muerte celular .....	255
Funcionalidad celular .....	257
Concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_c$ ).....	257
Amilasa.....	258
Modelo de Pancreatitis Aguda en células AR42J diferenciadas con membranas enriquecidas en PUFA n-3 .....	258
Efecto del ácido graso.....	258
Respuesta inflamatoria.....	258
Mecanismos de muerte celular .....	259
Funcionalidad celular .....	260
Concentración citosólica de calcio.....	260
Secreción de Amilasa .....	261
Efecto de la ceruleina.....	262
Respuesta inflamatoria.....	262
Mecanismo de muerte celular .....	263
Apoptosis/Necrosis.....	263
MTT .....	265
Funcionalidad celular .....	265
Concentración citosólica de calcio.....	265
Amilasa.....	266
Efecto del HT .....	267
Efecto del HT en el tratamiento con Ceruleina .....	269



Efecto del tipo de Perfil Lipídico de la membrana.....	270
CONCLUSIONES.....	277
BIBLIOGRAFÍA.....	283
SUMMARY .....	324
CONCLUSIONS.....	336
ANEXO.....	343

# **J**USTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

**E**n los últimos años ha habido un gran incremento en la literatura científica de estudios relacionados con el papel que la dieta mediterránea, recientemente proclamada por la UNESCO patrimonio inmaterial de la humanidad, en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas (Cardiovasculares, diabetes, cáncer, síndrome metabólico, etc.) y neurodegenerativas (distintos tipos de demencia, en particular Alzheimer). En estas publicaciones se sugiere que el patrón de alimentación mediterráneo ejerce sus efectos a través de algunos de sus ingredientes o alimentos que forman parte de él. Entre ellos cabe destacar el aceite de oliva, como principal grasa de adición, el consumo de pescado con frecuencia semanal y un alto consumo de frutas y verduras. Estos ingredientes aportan algunos nutrientes claves para estas acciones como el ácido oleico, ácido graso monoinsaturado, mayoritario en el aceite de oliva, los ácidos grasos omega 3 de cadena larga, como el EPA y DHA, presentes en la grasa de pescado y antioxidantes fenólicos que los aportan el propio aceite de oliva y el alto consumo de frutas y verduras.

Por otro lado, existen cada vez más pruebas de que en el origen de las enfermedades crónicas existen mecanismos comunes oxidativo-inflamatorios que subyacen en la iniciación y desarrollo de estas enfermedades. También se conoce que la dieta tiene un papel importante actuando a través de sus componentes (nutrientes y compuestos bioactivos) sobre estos procesos, evitando o disminuyendo la incidencia patológica de estos daños por sus efectos antioxidantes (compuestos fenólicos) y antiinflamatorios (ácidos grasos omega 3).

Asimismo, la importancia de las membranas biológicas en todos los procesos patogénicos celulares, y no solo como barrera, es cada vez más reconocida. La composición lipídica de las membranas, su perfil de ácidos grasos, tiene gran importancia por su implicación en los procesos de recepción de señales a través de los receptores de membrana, el inicio de cascadas de señalización celular y la formación de compuestos que afectan a la función celular, incluyendo la expresión diferencial de genes.

En este contexto hemos planteado esta memoria de Tesis doctoral en la que, utilizando un modelo de pancreatitis aguda en células AR42J diferenciadas hacia un fenotipo secretor acinar con dexametasona, hemos pretendido validar este modelo en respuesta a ceruleína y conocer si la modificación lipídica de las membranas con componentes de la dieta

mediterránea (ácido oleico y ácidos omega 3 de cadena larga) puede ejercer un efecto preventivo sobre la enfermedad. Además, hemos estudiado si la presencia, *per se* o la interacción con la modificación lipídica de membrana, de un compuesto antioxidante mayoritario en el aceite de oliva virgen, el hidroxitirosol, afectan la respuesta al daño celular.

### **Hipótesis de partida y objetivos.**

Esta memoria forma parte del proyecto de Investigación AGL2006.05005 financiado por la Dirección general de investigación. Ministerio de Educación y Ciencia que llevaba por título: “Estudio del efecto beneficioso de ingredientes funcionales de la dieta mediterránea (ac. grasos, comp. fenólicos) sobre procesos oxidativo-inflamatorios en un modelo *in vitro* de pancreatitis aguda”.

Nuestro grupo lleva trabajando en este tema los últimos 15 años realizando estudios *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* sobre la adaptación de la composición lipídica de las membranas de las células acinares al tipo de grasa de la dieta. Los resultados obtenidos anteriormente nos permiten plantear la hipótesis de partida que postula que algunos componentes típicos de la dieta Mediterránea (ácido oleico,  $\omega$ -3 de cadena larga e hidroxitirosol) tienen un papel modulador sobre los mecanismos celulares implicados en el desarrollo de una enfermedad oxidativo-inflamatoria, la pancreatitis aguda. Pretendemos demostrar científicamente su posible efecto como ingredientes funcionales en la prevención y/o atenuación de la gravedad de este tipo de alteración patológica. Actualmente no existe ningún trabajo en el que se examine cómo los ácidos grasos y antioxidantes afectan los mecanismos celulares del proceso inflamatorio local en el páncreas y tampoco se ha examinado esto desde un punto de vista preventivo, es decir, mediante un modelo experimental en el que el daño celular se induce *a posteriori* tras el tratamiento previo con los componentes nutricionales.

Esta hipótesis de trabajo se adecua a las directrices de la OMS que recogen lo siguiente: “se necesita más investigación básica sobre algunos aspectos de los mecanismos celulares que relacionan dieta y salud” y los del plan nacional de investigación que establece que se debe “demostrar científicamente la funcionalidad y el posible efecto beneficioso de los alimentos e ingredientes funcionales”.

**Objetivo 1.** Determinar si la modificación del perfil de ácidos grasos de las membranas celulares inducida por la presencia de MUFA y PUFA n-3 de cadena larga (ingredientes funcionales de la dieta Mediterránea) afecta a:

- La producción de mediadores inflamatorios, analizando factores pro y antiinflamatorios (IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-6) y activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)
- Los mecanismos de muerte celular como indicadores de la gravedad del daño celular, tisular y orgánico para lo que realizamos ensayos de apoptosis/necrosis, citotoxicidad celular mediante ensayo del MTT
- La funcionalidad celular en los procesos de secreción exocrina. Para ello determinamos los cambios en concentraciones y movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular, como vía de señalización de la célula y secreción de amilasa como proceso final.

**Objetivo 2.** Evaluar si la presencia de un compuesto fenólico (hidroxitirosol) con actividad antioxidante y componente mayoritario en la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen afecta a los procesos recogidos en el Objetivo 1 mediante la determinación de los mismos parámetros.

**Objetivo 3.** Examinar si existe una interacción positiva entre los ingredientes funcionales incluidos en los objetivos 1 y 2 (ácidos grasos e hidroxitirosol) sobre los procesos anteriores.

En esta Memoria se recogen los resultados obtenidos en relación con el desarrollo y validación del modelo experimental en células AR42J diferenciadas con dexametasona y tratadas con ceruleína y cómo la modificación del perfil lipídico de las membranas por la presencia en el medio de ácido oleico (C18:1 n-9), mayoritario en el aceite de oliva o de los ácidos eicosapentaenoico (EPA: C20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA: C22:6 n-3) presentes en la grasa de pescado modifica la respuesta celular a este estímulo nocivo. También se ha estudiado el papel que tiene la presencia de un antioxidante, hidroxitirosol, presente en la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen y su interacción con la respuesta en las células con modificación de membrana sobre el daño celular y los mecanismos implicados en él.



# **A**NTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS





## ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

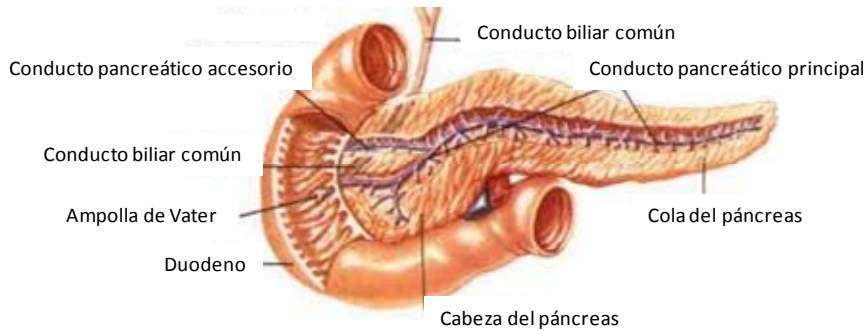
### **Páncreas. Aspectos generales.**

El páncreas es una glándula túbulo-acinar compuesta, que se encuentra en la región superior de la cavidad abdominal, a nivel de la primera y segunda vértebras lumbares (L1 y L2) junto a las suprarrenales y por detrás del estómago, formando parte del contenido del espacio retroperitoneal.

Es un órgano impar de color rosado, y está claramente lobulado a simple vista, debido a la inclusión hacia el interior del tejido conectivo que lo rodea. Cada uno de estos lóbulos macroscópicos está compuesto por muchos lóbulos microscópicos, los cuales son la unidad funcional del páncreas exocrino. Cada lóbulo microscópico está compuesto por una gran proporción de células (células acinares) que sintetizan enzimas digestivas, almacenándolas en su interior en forma de gránulos de zimógeno y una proporción mucho más pequeña de células (células ductales) que comprenden el sistema ductal (ductos intralobulares e interlobulares) (Go, 1993).

Este órgano pesa aproximadamente 100 g en hombre adulto y 85 g en mujer adulta, pesando alrededor de 5 g en recién nacidos. Mide entre 14 y 18 cm de largo; entre 2 y 9 cm de ancho; y entre 2 y 3 cm de espesor, y está dividido en cuatro regiones (figura 1):

- Cabeza, donde se encuentra concentrada la mayor parte de la masa, y enmarcada por el duodeno.
- Cuello, una zona adelgazada de adelante hacia atrás situada a la derecha de la cabeza y anterior a los vasos mesentéricos superiores.
- Cuerpo, se extiende posterior al estómago hacia la derecha y va disminuyendo, sin una frontera determinada en la cola.
- Cola, la cual termina adyacente al bazo.



**Figura 1.** Esquema anatómico del páncreas. Principales conductos pancreáticos.

El drenaje de la glándula se realiza a través del sistema de ductos, que puede ser dividido en tres partes. Una primera parte discurre dentro del lóbulo donde, luz de los acinos drena en unos pequeños conductos, los intercalares, y varios de ellos drenan en un conducto intralobular. Una segunda parte, los conductos intralobulares drenan en los interlobulares, que se localizan dentro del tejido conectivo interlobular junto con las grandes ramas de vasos y nervios. Los ductos interlobulares drenan en el interior de la tercera parte, el ducto pancreático principal (canal de Wirsung (figura 1)). Éste comienza en la cola y recorre longitudinalmente toda la glándula, recibiendo en su recorrido los numerosos ductos secundarios que se unen de una forma regular y casi en ángulo recto, hasta llegar a la cabeza, donde también se encuentra el ducto colédoco, penetrando ambos en la pared duodenal. Lo pueden hacer por separado, aproximadamente un 18% de las veces, o unirse en dicha pared para formar la ampolla de Vater, en un 80% de los casos, y vierten su contenido en el interior del lumen duodenal (Hand, 1963).

Son numerosas las estructuras vasculares que penetran la glándula. Se encuentran aquellas que suministran a la misma y otras que pasan hacia otras localizaciones. El aporte sanguíneo lo recibe desde dos grandes ramas que surgen de la aorta: el tronco celiaco y la arteria mesentérica superior. De éstas parten ramas que se subdividirán en pequeños vasos que irrigan el tejido pancreático. El drenaje venoso se lleva a cabo a través de la vena esplénica y mesentérica superior, las cuales se unen confluyendo en la vena porta.

La inervación pancreática extrínseca corre a cargo de ramas de las divisiones parasimpática y simpática del sistema nervioso autónomo, siendo más abundante en la cabeza del páncreas que en la cola (Gorelick y Jamieson, 1987). Las fibras nerviosas parasimpáticas preganglionares llegan a través del nervio cago, atraviesan el ganglio celíaco sin realizar sinapsis y terminan en los ganglio pancreáticos intrínsecos. Las fibras postganglionares se

distribuyen entre los lobulillos pancreáticos y alrededor de los acinos. Las fibras simpáticas preganglionares son conducidas a través de los troncos espláncnicos (los cuales nacen de los ganglios torácicos V y IX) hasta el ganglio celíaco. Tras hacer sinapsis aquí, las fibras postganglionares se dirigen paralelamente a la arteria hepática y a la arteria mesentérica superior, y a las ramas de estas, para así inervar la red vascular pancreática (Bockman, 1983).

El sistema nervioso intrapancreático está constituido por plexos con pequeños ganglios interconectados, localizados principalmente a nivel de tejido conectivo interlobular. A ellos llegan fibras vagales preganglionares, fibras postganglionares procedentes de los ganglios simpáticos y posiblemente otras fibras de la pared intestinal. Este sistema contiene mayoritariamente neuronas colinérgicas, pero también aminérgicas y peptidérgicas, siendo en este último caso el péptido intestinal vasoactivo (VIP), somatostatina y encefalina los principales péptidos implicados (Case y Argent, 1993).

Desde el punto de vista funcional el páncreas es una glándula mixta, constituida por una porción endocrina y una exocrina. El 85% de la glándula corresponde a la porción exocrina perteneciente a los acinos pancreáticos, mientras que la porción endocrina representa solamente un 2% de la masa pancreática. Alrededor de un 10% es matriz extracelular y comprendiendo aproximadamente un 4% del volumen de la glándula se refiere a células ductales y vasos sanguíneos (Johnson et al., 2006). Las funciones exocrinas y endocrinas son llevadas a cabo desde dos grupos diferentes de células.

La unidad secretora fundamental del páncreas exocrino es el acino. Está formado por una colección de entre 20 y 200 células acinares, contiguas a las células centroacinares y células ductales, las cuales constituyen el sistema de ductos. Cada uno de estos componentes tiene una función la cual está regulada de una forma coordinada con el fin de elaborar la mezcla del jugo pancreático (Go, 1993). El jugo pancreático es un fluido acuoso, incoloro, de viscosidad variable -dependiendo de su riqueza en proteínas-, y de pH comprendido entre 7 y 9, dependiendo de las especies. Está constituido por dos fracciones diferentes: una fracción hidroelectrolítica constituida por cationes como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , entre otros, y aniones como  $\text{CO}_3\text{H}^-$  y  $\text{Cl}^-$  principalmente, aunque también aparecen otros iones en cantidades inferiores (fosfatos, sulfatos, azufre, fósforo y zinc) y asociados a otras moléculas; y una fracción enzimática (Ribet et al., 1985). Estos productos de secreción son transportados por el conducto pancreático hasta el duodeno, donde participan en la

digestión enzimática de las proteínas, grasas y glúcidos provenientes de la dieta (Susumu, 1977).

El tejido endocrino está constituido por unos acúmulos de distintos tipos celulares que constituyen los islotes de Langerhans. Tiene una función netamente endocrina. Se encargan de producir hormonas implicadas fundamentalmente en la regulación del metabolismo glucídico, como la insulina y el glucagón.

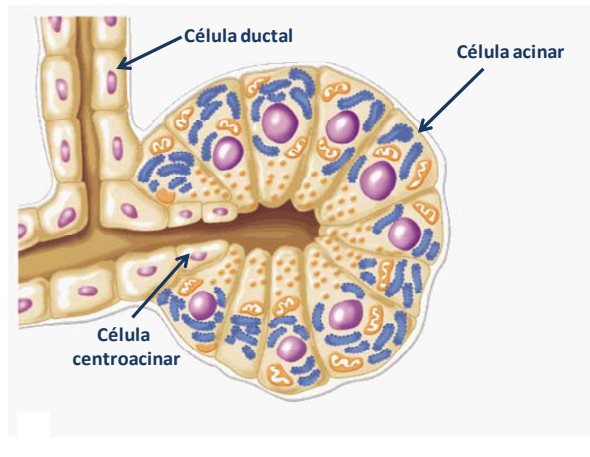
Ambas porciones se encuentran íntimamente relacionadas, distribuyéndose los islotes de Langerhans a través de todo el tejido pancreático, alrededor de las células acinares.

## **Páncreas Exocrino**

### ***Acino pancreático***

Desde los estudios desarrollados por Heidehain y cols. (1921) que pusieron de manifiesto que las células ductulares y las acinares tenían una división dicotómica formando estructuras en ramas, este concepto ha sido reconstruido en detalle, demostrando que la organización de ductos y acinos dentro del lóbulo es mucho más compleja. (Akao et al., 1986; Bockman et al., 1983).

El acino pancreático (figura 2) está constituido por un conjunto de células uniestratificadas que tienden a adoptar una forma esférica u ovoide, son las células acinares. Estas células se disponen alrededor de un espacio, el lumen acinar, y están rodeadas por una matriz de tejido conectivo que también alberga las células constituyentes del sistema ductal. Esta matriz tiene numerosas funciones, entre ellas, fijar citocinas y factores de crecimiento con el fin de que estén disponibles para cuando se necesiten, y actuar como una barrera física ante agentes infecciosos. Es aquí donde los macrófagos y las células inmunes juegan su papel durante la infección y procesos inflamatorios (Johnson et al., 2006).



**Figura 2.** Esquema del acino pancreático junto con las células ductales y células centroacinares. Se aprecia la polaridad en la distribución intracelular de la célula acinar.

El lumen acinar se encuentra aislado de los espacios intercelulares debido a la unión entre unas y otras células mediante complejos de unión, clasificados funcionalmente en tres grupos: uniones sellantes, uniones adherentes, y uniones comunicantes (Farquhar and Palade, 1981).

Las uniones sellantes se encuentran también entre las células ductales vecinas, y proporciona una barrera impermeable entre contenido luminal y el espacio intersticial (Farquhar and Palade, 1981). Las uniones comunicantes (tipo Gap), permite que las células estén funcionalmente conectadas unas con otras mediante la interacción directa entre citoplasmas de células acinares adyacentes. Las uniones Gap tienen como principal función fisiológica coordinar la señalización intercelular, permitiendo el movimiento, a través de la unión, de moléculas e iones como calcio iónico libre ( $\text{Ca}^{2+}$ ), inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Existen estudios que sugieren una modulación de la secreción pancreática por parte de este tipo de uniones (Chanson et al., 1998; FEROSard et al., 2003).

### *Célula acinar*

El páncreas exocrino tiene el mayor porcentaje de síntesis de proteínas de todos los órganos de cuerpo. La célula acinar es la encargada de sintetizar esta gran cantidad de proteínas, las enzimas digestivas, y de secretarlas al lumen. Esta secreción se realiza a través de un proceso ordenado y secuencial, donde se encuentran involucradas una serie de

organelas específicas. La mayoría de estas enzimas, con el fin de evitar la autodigestión de la glándula, son sintetizadas y almacenadas dentro de la célula en forma de precursores inactivos, conocidos como zimógenos. Y es en el intestino delgado, donde unas enteroquinas específicas del borde en cepillo rompen el zimógeno tripsinógeno para dar lugar a la tripsina, forma ya activada, y ésta es la encargada de activar el resto de zimógenos pancreáticos.

Al microscopio óptico las células acinares presentan una forma piramidal con el vértice dirigido hacia la luz del acino, cuyo diámetro varía en función de la actividad secretora, siendo menor cuando el acino está en reposo (Bloom and Fawcett, 1981).

La célula acinar pancreática está polarizada. La región infra- y paranuclear del citoplasma se encuentra ocupada principalmente por el retículo endoplasmático rugoso (RER), mientras el aparato de Golgi y los gránulos de zimógeno se encuentran localizados, predominantemente, en el polo apical de la célula. En una imagen obtenida por microscopía electrónica, se puede ver el aparato de Golgi como una estructura en forma de herradura compuesta por 3-5 láminas de cisternas aplanadas rodeadas de membrana y numerosas vesículas, la mayoría de las cuales muestran una superficie lisa, mientras otras muestran una borrosa cubierta externa. Se pueden distinguir dos caras en el aparato de Golgi (Farquhar and Palade, 1981), una cara orientada hacia los elementos del RER y otra cara interna cóncava con gránulos de zimógeno en diferentes estados de formación y lisosomas. Los gránulos de zimógeno maduro son almacenados en polo apical de la célula bajo la membrana plasmática, la cual proyecta numerosas microvellosidades hacia el espacio luminal. El interior de cada microvellosidad está formado por paquetes de microfilamentos anclados a la cara interna de la membrana plasmática, y recorren en paralelo la longitud de ésta, extendiéndose como una red filamentosa (membrana terminal) (Go, 1993). Estudios inmunocitoquímicos, a través del uso de anticuerpos frente actina, miosina, tropomiosina y  $\alpha$ -actinina (Drenckhahn and Mannherz, 1983) han demostrado la presencia de estas proteínas contráctiles en esta red terminal, sugiriendo una participación por parte de esta red en el transporte activo y movimientos de los gránulos secretores durante la estimulación de la célula acinar.

### *Células centroacinares*

Son células ductales localizadas dentro del acino (Susumu, 1977). Adquieren un aspecto aplanado y se interponen entre algunas células acinares dentro del lumen acinar (figura 2). A diferencia de las células ductales su membrana basolateral es lisa. Son más pequeñas que las células acinares y participan en la secreción de fluidos y de electrolitos (Zelander et al., 1962).

### ***Sistema ductular***

Está constituido por células ductales y, además de constituir el sistema de conducción de las enzimas digestivas, participan en la elaboración del jugo pancreático, aportando el componente fluido, bicarbonato, y otros iones (Harper et al., 1979; Schulz, 1981).

Se puede dividir en tres partes: la primera parte se refiere a los conductos intercalares, donde el acino pancreático secreta el jugo pancreático, que a su vez drenarán en los conductos intralobulares; la segunda parte, los conductos interlobulares, que recorren el tejido conectivo interlobular junto con las principales ramas de vasos y nervios, y drenan en la tercera parte que es el ducto pancreático principal.

La célula ductal presenta microvellosidades en el borde libre y la membrana basolateral presenta interdigitaciones en los conductos intralobulares (Kern, 1986). El citoplasma de la célula ductular parece estar vacío en comparación con el de la célula acinar. Presenta pocas mitocondrias, un aparato de Golgi poco desarrollado y un pequeño RER.

### ***Enzimas Pancreáticas Digestivas***

El componente enzimático del jugo pancreático contiene enzimas muy importantes para la digestión de la mayor parte de los alimentos. La ausencia completa de estas enzimas supondría un problema de malaabsorción de lípidos, proteínas y carbohidratos.

Las enzimas pancreáticas son de diversos tipos:

- Hidrolasas:  $\alpha$ -amilasa.
  
- Proteasas:



- Endopeptidasas: tripsina, quimiotripsina, elastasa y calicreína.
- Exopeptidasas: carboxipeptidasas A y B.

Se secretan en forma de zimógenos, como tripsinógeno, quimiotripsinógeno, proelastasa, precalicreína, y procarboxipeptidasa A y B.

- Enzimas lipolíticas: lipasa, fosfolipasa A2, y carboxil ester hidrolasa.

Dentro de este tipo de enzimas, es la fosfolipasa A2 la que se secreta como zimógeno, profosfolipasa A2.

- Nucleasas: ribonucleasa y desoxirribonucleasa I.

Al igual que el resto de enzimas pancreáticas, la amilasa tiene un papel vital en la nutrición humana. Pero su rápida y fácil detección en el suero, la convierte en el parámetro bioquímico más usado en el diagnóstico de enfermedades pancreáticas (Mitchell et al., 2003).

### *Amilasa Pancreática*

Dado el carácter primordialmente secretor de la célula acinar, la determinación de amilasa secretada, es un parámetro imprescindible para conocer si existe una alteración en la funcionalidad celular.

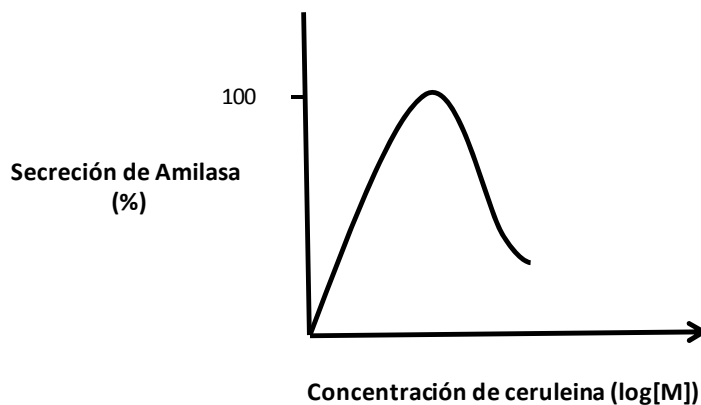
Stiefel y Keller (Stiefel and Keller, 1973) consiguieron aislarla del jugo pancreático humano, purificarla y caracterizarla. Es una glicoproteína de 50-56 KDa con un punto isoeléctrico de 7.1 y que tiene un grupo -SH, el cual es esencial para su actividad.

Se trata de una endoenzima cuya función principal es catalizar la degradación hidrolítica del almidón (amilosa y amilopectina procedentes de plantas) y el glucógeno (de origen animal). Hidroliza los enlaces  $\alpha$  (1-4) de la amilosa y la amilopectina en diferentes puntos de la de la cadena, pero alejados de los puntos de ramificación (enlaces  $\alpha$  (1-6)) y de los extremos. En esa reacción se liberan maltosa, maltotriosa y una mezcla de otros oligosacáridos (Stiefel

and Keller, 1973). Dependiendo de la especie animal, cada amilasa, dependiendo del número de grupos-SH que contenga, muestra un patrón de acción diferente.

La acción de amilasa es dependiente de los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y cloro ( $\text{Cl}^-$ ), y su pH óptimo es entre 7.5 y 8.0. Se inhibe con cobre y otros metales pesados. El iodoacetato también tiene un efecto inhibitor, particularmente después de quelar  $\text{Ca}^{2+}$  con EDTA.

In vivo, la típica curva dosis-respuesta a secretagogos clásicos como la colecistocinina (CCK), es bifásica. Se ha visto que, la infusión de  $0.2 \mu\text{g Kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  de ceruleina, un análogo de la CCK, en ratas, produce una pancreatitis en estos animales, marcada por hiperamilasemia y edema pancreático (Saluja et al., 1989). En el caso de la curva concentración-respuesta de amilasa en células acinares, *in vitro*, la concentración máxima de ceruleina es  $10^{-10}$  M, observando una disminución de la curva a partir de esta concentración (figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de la secreción de amilasa por células acinares pancreáticas estimuladas con concentraciones crecientes de ceruleina. La dosis supramáxima de ceruleina inhibe la secreción.

### ***Síntesis y Secreción de enzimas digestivas***

La síntesis comienza en el retículo endoplasmático rugoso (RER), que es retículo endoplasmático (ER) asociado con ribosomas. Aunque el ER es mucho más evidente en la zona basal de la célula acinar, este se extiende hasta la zona apical. Las cisternas del ER

tienen una anchura de 20-80 nm y se ensanchan durante la síntesis de proteínas. Los lugares de síntesis de proteína se caracterizan por la unión de ribosomas a la cara citosólica de la membrana del RE. Estos ribosomas están asociados a RNA mensajero y representan áreas activas de traducción.

El ribosoma está constituido por las dos subunidades, una grande y una pequeña, del complejo macromolecular ribosómico, el cual está formado a partes iguales por ARN ribosómico y proteínas ribosómicas. Se pueden distinguir dichas subunidades mediante microscopía electrónica de transmisión. La síntesis de la nueva proteína tiene lugar en el surco que hay entre ambas subunidades y está dirigida por ARNm. Un grupo específico de proteínas solubles regulan la iniciación, la elongación y la terminación de la síntesis. Como en toda proteína que ha de ser secretada lo primero que se sintetiza es una extensión amino-terminal específica que se conoce como *secuencia señal*. Se trata de un péptido de entre 15 y 20 aminoácidos que tiene un corazón hidrófobo. Esta secuencia señal permite la entrada de la proteína naciente al ER a través de un canal que se conoce como *traslocon* (Higy et al., 2004; White and von Heijne, 2004). Este acontecimiento es crítico en la fase inicial de la síntesis. Una vez dentro, se efectúa el plegamiento de la proteína con la ayuda de proteínas residentes en el RE como, calnexina y la proteína de choque térmico HSP70, entre otras, que facilitan y monitorizan un ensamblaje correcto, asumiendo por tanto, su estructura terciaria (Ellgaard y Helenius, 2003; Kleizen y Braakman, 2004). También tienen lugar una serie de modificaciones específicas, como es la formación de enlaces disulfuro, muy importantes en las proteínas secretoras, ya que a diferencia de las citosólicas necesitan protegerse del ambiente oxidante cuando salen de la célula.

La proteína naciente se mueve de forma vectorial a través de la célula acinar hasta llegar a la membrana plasmática apical y secretarse. En este desplazamiento se sigue sometiendo a varias modificaciones, muchas de ellas dentro de orgánulos celulares específicos.

El primer paso en ese desplazamiento es la preparación de la proteína secretora naciente dentro de vesículas para el transporte hacia el aparato de Golgi. Una vez dentro, tiene lugar la formación de la vesícula de secreción o gránulo de zimógeno, concretamente en el Golgi trans. Muchas de las enzimas digestivas se sintetizan y secretan en forma de precursores inactivos, conocidos como zimógenos, con el fin de evitar la autodigestión de la glándula.

Para una correcta secreción en respuesta al estímulo adecuado, primero el gránulo se debe de mover desde su lugar de formación en el Golgi trans hasta la región apical de la célula.

Este proceso requiere probablemente la participación activa de elementos contráctiles, particularmente la actina, existiendo por tanto, una regulación por parte de la red de actina situada entre el gránulo de zimógeno y la membrana plasmática apical (Muallem et al., 1995; Valentijn et al., 2000). Al atravesar la red de actina el gránulo de zimógeno queda envuelto por esta, y en contacto con la membrana plasmática.

Una vez que el gránulo está en contacto con la membrana plasmática apical ocurren una serie de interacciones específicas entre ambas membranas. Estas interacciones son altamente específicas con esta zona de la membrana, con el fin de evitar que el gránulo se fusione con la membrana basolateral y se produzca el vertido de la proenzimas en el espacio intercelular, pudiéndose activar de este modo dentro de la glándula. Tras la interacción con la membrana apical, el gránulo de zimógeno queda inmovilizado. Se forma un complejo donde ambas membranas se fusionan, la parte hidrofóbica de ambas queda expuesta hacia el exterior, en un paso que requiere ATP, y el contenido del gránulo queda libre para difundir hacia el interior del lumen acinar (Bonifacino y Glick, 2004).

De acuerdo con el modelo más aceptado de fusión de membranas, este proceso está dominado por dos tipos de proteínas, las proteínas SNARE y pequeñas proteínas G de la familia de las Rab, particularmente Rab3D. Existen unas proteínas SNARE en la membrana del gránulo, v-SNAREs, que interactúan con otras localizadas en la cara citosólica de la membrana apical, t-SNAREs, y un conjunto de factores de adhesión. La proteína Rab3D interviene también en este acoplamiento y en la fusión del gránulo de zimógeno recubierto por la red apical de actina y la membrana plasmática (Chen et al., 2002).

Tras la fusión de ambas membranas y liberación de las enzimas secretoras en el interior del lumen acinar, el exceso de membrana es eliminado de la superficie mediante un proceso de invaginación mediado por la proteína clatrina y la red terminal de actina (Valentijn et al., 1999a; Valentijn et al., 1999b).

### ***Regulación de la Secreción Pancreática Exocrina***

La principal función de la secreción pancreática exocrina es facilitar la digestión de los alimentos y la absorción de micronutrientes. La función de las enzimas pancreáticas es romper los macronutrientes tales como las proteínas en pequeños péptidos y aminoácidos, los triglicéridos en ácidos grasos y monoglicéridos, y los carbohidratos en azúcares

sencillos, de modo que puedan ser absorbidos fácilmente en el intestino delgado. La secreción pancreática de bicarbonato neutraliza los ácidos gástricos y crea un ambiente intraluminal favorable, con un pH adecuado, para la actuación de las enzimas, especialmente en la digestión de grasas (Borgström, 1993). Estas enzimas digestivas son esenciales para llevar a cabo una buena absorción de los nutrientes ingeridos, evitando una malnutrición (DiMagno et al., 1973).

La secreción pancreática está controlada por una serie de factores nerviosos y hormonales. Estos factores, que se denominan primeros mensajeros, actúan sobre sus receptores localizados en la membrana plasmática de las células pancreáticas generando una serie de señales intracelulares que conducen a toda una cadena de acontecimientos conocida con el nombre de *acoplamiento estímulo-secreción* que, finalmente desencadenará una respuesta celular.

### *Regulación Nerviosa*

Durante varias décadas se ha pensado que el nervio vago y las hormonas CCK y secretina eran los únicos reguladores de la secreción pancreática. Sin embargo, hoy en día está bastante claro que las múltiples vías neurales implican a un gran número de neurotransmisores y neuropéptidos diferentes, además de existir una gran variedad de hormonas, factores todos ellos con un efecto estimulador o inhibitorio sobre la secreción.

### Regulación colinérgica.

El principal papel de las neuronas intrapancreáticas colinérgicas está relacionado con la estimulación de la secreción pancreática. Durante la fase cefálica de la secreción pancreática, la regulación se realiza a través de reflejos neurales largos (cefálicos) que se inician en diferentes estructuras sensoriales y que llegan al páncreas directamente desde el SNC. Por su parte, la regulación de la secreción durante las fases gástrica e intestinal se lleva a cabo a través de vías que, iniciándose en estómago e intestino, alcanzan el páncreas tras integrarse en el SNC (reflejos largos vago-vagales) o se dirigen directamente al páncreas (reflejos cortos, gastro-pancreáticos o entero-pancreáticos). Todas estas vías convergen en neuronas intrapancreáticas colinérgicas que liberan acetilcolina. La cual se une a sus receptores muscarínicos de las células acinares (y ductulares en menor grado) estimulando fundamentalmente la secreción de enzimas. Existen interacciones positivas (efectos aditivos

o potenciadores) entre la Ach y hormonas (como la secretina) o neuropéptidos (VIP) (Johnson et al., 2006).

### Regulación adrenérgica

Las fibras adrenérgicas, que contienen el neurotransmisor noradrenalina, se han considerado inhibidores de la secreción pancreática. Sin embargo, es difícil encontrar estudios que establezcan claramente este efecto, debido a los muchos efectos tan diversos de la estimulación nerviosa simpática o bien, a los efectos inespecíficos que se observan tras la administración de agentes adrenérgicos. Se ha descrito una inhibición de la secreción pancreática tras la estimulación eléctrica de los nervios espláncnicos (Barlow et al., 1971; Holst, 1986), mientras que la sección de los mismos da lugar a un incremento en la secreción pancreática (Klein et al., 1988).

A pesar de los diversos resultados obtenidos, actualmente no existen evidencias suficientes como para poder afirmar que la regulación adrenérgica de la secreción pancreática exocrina, sea importante más allá de la inhibición de la secreción del fluido y bicarbonato, que probablemente ocurre a través de efectos directos o indirectos sobre el flujo sanguíneo pancreático (Johnson et al., 2006).

### Regulación peptidérgica

Existen evidencias acerca de la presencia en los plexos intrínsecos de fibras nerviosas peptidérgicas que podrían participar en el control de la secreción pancreática exocrina. Entre los péptidos producidos por estas neuronas intrapancreáticas destacan la somatostatina, encefalina, VIP y la sustancia P (Dockray, 1987). Estos péptidos pueden representar un importante factor modulador de la actividad secretora a través de su liberación (Chey and Chang, 2001; Walsh, 1987).

La somatostatina es un potente inhibidor de la secreción enzimática in vivo (Singh et al., 1988). La encefalina inhibe la secreción modulando las rutas colinérgicas (Dockray, 1987). El VIP estimula la respuesta secretora del fluido y enzimas (Jensen, 1994). La sustancia P también ejerce una acción estimuladora de la secreción pancreática mediante la activación de la fosfolipasa C (May et al., 1978).

### *Regulación Hormonal*

La observación de una respuesta pancreática similar tanto en páncreas, autotrasplantados, tanto inervados como no inervados, sugirió una regulación de la secreción pancreática por parte de hormonas circulantes (Wang y GEROSman, 1951).

Actualmente se sabe que, además de interactuar con factores nerviosos, estos transmisores hormonales participan en importantes mecanismos de regulación de la secreción pancreática exocrina (estimulación e inhibición). Históricamente, se han considerado la secretina y la colecistocinina (CCK), como los principales reguladores hormonales del páncreas exocrino en la respuesta a la comida.

#### Secretina

Es un péptido producido por las células S duodenales y presenta dos formas moleculares (27 y 30 aminoácidos). Pertenece a la familia de las secretinas, todas ellas, hormonas o neuropéptido, con la misma homología estructural: secretina, glucagón, péptido intestinal vasoactivo (VIP), péptido histidina isoleucina (PHI) y polipéptido activador de la adenilil ciclasa de pituitaria (PACAP-27 y PACAP-38) (Vaudry et al., 2000). El principal papel fisiológico de esta hormona gastrointestinal es proporcionar unas condiciones óptimas en el intestino para una digestión de los alimentos a través de la estimulación de la liberación de un fluido rico en bicarbonato desde las células ductulares del páncreas (Gray et al., 1988) y desde los colangiocitos del hígado (Kanno et al., 2001). El principal estímulo para la liberación de secretina es la presencia en el duodeno de ácidos estomacales, aunque algunos ácidos grasos ingeridos también contribuyen a dicha liberación. Así, la presencia de ácidos grasos de cadena larga como el ácido oleico provoca la liberación de una cantidad significativa de secretina.

La secretina parece tener también un papel neuroactivo sobre el sistema nervioso central (SNC). Como neuropéptido, se ha encontrado expresión de secretina (Sct) y receptores de secretina (Sctr), en varias regiones del cerebro, incluyendo cerebelo, hipocampo, hipotálamo, y tronco cerebral, encontrando en estos últimos áreas específicas que participan en la integración de la señal nutricional y control de apetito (Lee et al., 2005). El efecto de la secretina sobre el control del apetito se ha demostrado en varios estudios, encontrando en ovejas una disminución del apetito tras una inyección intravenosa de secretina (Grofum, 1981; O'Donohue et al., 1981).

A pesar de su papel esencial como estimulador de la secreción de fluido y bicarbonato, la secretina no parece ser la única responsable de la respuesta en estos componentes, y parece ser que otros secretagogos también actúan estimulando dicha secreción de manera conjunta, entre los que se encuentran la CCK y la acetilcolina (ACh).

## CCK

La colecistocinina (CCK) es una hormona polipeptídica producida por dos tipos de células distintas, células endocrinas I, en el intestino delgado, y neuronas del sistema nervioso central y periférico (Walsh, 1987). Puede actuar por tanto, como hormona circulante o como neuropéptido. Los principales componentes dietarios que estimulan de liberación de CCK son los productos de digestión de grasas y proteínas.

Esta molécula fue originariamente aislada y purificada del intestino delgado del cerdo como un péptido de 33 aminoácidos. Es una hormona de la que se han descrito numerosos tipos moleculares con 4, 5, 8, 12, 21, 33, 39 y 58 aminoácidos. Destaca una característica estructural, esencial para su actividad, y es la presencia de un aminoácido en la posición 7 del extremo carboxilo terminal, un residuo de tirosina que puede estar sulfatado o no (Marx et al., 1987). Esta sulfatación es esencial en la colecistocinina octapéptida (CCK-8), para la actividad estimuladora del páncreas (Jensen y Gardner, 1981).

La principal acción de la CCK sobre la célula acinar pancreática es la estimulación de la secreción de enzimas pancreáticas (GEROsman, 1977). Además interviene en la contracción de la vesícula biliar, y la inhibición del vaciamiento gástrico y de la ingesta de alimentos. El conjunto de estas acciones permiten una óptima digestión de los alimentos en el intestino delgado. Aunque pueda existir una acción directa de la hormona sobre las células acinares pancreáticas y las células del músculo liso del estomago, parece ser que también ejerce una acción sobre neuronas aferentes del nervio vago, a través de receptores tipo 1 (CCK1), que provoca una estimulación refleja de la secreción pancreática y la inhibición del vaciamiento gástrico (Forster et al., 1990; Li and Owyang, 1994; Moran et al., 1987).

Los efectos concretos sobre las células acinares serían:

- Estimulación de la secreción de enzimas digestivas (GEROsman, 1977; Marx et al., 1987; Williams y Blevins, 1993).



- Estimulación de la síntesis de proteínas (Williams y Blevins, 1993).
- Regulación de la expresión génica (Lu and Logsdon, 1992; EROewicz et al., 1989).
- Estimulación del crecimiento celular, mediante un incremento en la síntesis de ADN (Hoshi y Logsdon, 1993), y de la proliferación celular (Williams y Blevins, 1993).
- Estimulación de la captación de glucosa (Williams y Blevins, 1993).

Se han caracterizado dos tipos de receptores CCK, CCK1 y CCK2. CCK1 es específico de CCK, mientras que a los receptores CCK2 se pueden unir tanto CCK como gastrina, ambos con una alta afinidad (Wank, 1998; Williams y Blevins, 1993). Los receptores CCK1 pueden asumir dos estados, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad, asignándose a cada estado diferentes acciones celulares (Williams y Blevins, 1993). Por ejemplo, con respecto a la secreción de amilasa de la célula acinar, el estado de alta afinidad mediaría la estimulación de dicha secreción, y el de baja afinidad la inhibición de la misma. Las diferentes acciones de ambos estados se ven claramente reflejadas en la curva dosis-respuesta de la secreción de amilasa, donde concentraciones crecientes de CCK-8, en principio producen un máximo de secreción pero luego disminuye (Gardner and Jensen, 1993). Existen estudios que sugieren que esto se debe a que concentraciones altas de CCK-8 (1nM-1µM), inhiben la secreción de amilasa debido a que los receptores de baja afinidad bloquean un paso, dependiente de MgATP, de la exocitosis (Padfield and Panesar, 1998; Saluja et al., 2007). A dosis fisiológicas, la CCK-8 es un agonista de la secreción pancreática, sin embargo dosis supramáximas desencadenan una respuesta inflamatoria y muerte celular, características de la pancreatitis humana (Gukovsky et al., 1998; Williams, 2001).

Existen dos péptidos naturales relacionados estructuralmente con la CCK, la gastrina y la ceruleína. Los efectos de la gastrina sobre la secreción pancreática exocrina son similares a los de la CCK, aunque de menor potencia (Stening and GEROsman, 1969), mientras que el efecto de la ceruleína sobre la secreción pancreática exocrina, es tan potente como el de la CCK-8 (Anastasi et al., 1968).

### Hormonas inhibitoras

Hay otros agentes hormonales que tienen un efecto inhibitor sobre la secreción del páncreas exocrino. Entre ellos podemos citar al polipéptido pancreático (PP) secretado en

los islotes pancreáticos y que se libera en respuesta a la presencia de productos de la digestión de proteínas y grasas y el PYY (péptido tirosina-tirosina) que se libera en el intestino delgado distal y colon proximal en respuesta, principalmente, a los productos de la digestión de las grasas (Go et al., 1993).

## **Mecanismos de Acoplamiento Estímulo-Secreción en la célula acinar**

### ***Receptores de membrana***

Las células son capaces de detectar y responder ante una amplia colección de estímulos procedentes tanto del ambiente externo como fuentes endógenas. Dentro de los estímulos ambientales se incluyen señales tan diversas como fotones, moléculas de olor y sabor y agentes físicos o químicos, tanto tóxicos como inocuos. Como estímulo endógeno se encuentra un amplio rango de hormonas, muy diferentes entre ellas estructuralmente, neurotransmisores y sustancias paracrinas.

Los receptores que se encuentran en la membrana plasmática detectan estos estímulos y señalizan una respuesta fisiológica apropiada ante dicho estímulo. Estos receptores de la superficie celular se dividen en varias familias en base a su estructura y mecanismos de acción. Una de estas familias es la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que es, con diferencia, el grupo más amplio y con mayor diversidad funcional. Dentro de este grupo de GPCRs se incluyen los receptores de la mayoría de las hormonas hidrosolubles y neurotransmisores. Son proteínas con 7 dominios transmembrana que interaccionan con proteínas G heterotriméricas e inician la señal de transducción.

Existe otro grupo de receptores de superficie celular, también muy importante, que atraviesan la membrana plasmática y tienen actividad enzimática intrínseca o asociada. Este grupo se divide en cinco familias dependiendo de la naturaleza de su actividad enzimática: receptores tirosin cinasa (RTKs), receptores asociados a tirosin cinasa, receptores tirosin fosfatasa, receptores serin-treonin cinasa, y receptores guanil ciclasa. Dentro de esta familia se incluyen los receptores de factores de crecimiento, ciertas hormonas, y mediadores inmunes; e inician la señalización mediante la activación de su actividad enzimática

intrínseca o asociada. Todas estas categorías de receptores de superficie celular juegan un papel crucial en la regulación del tracto gastrointestinal en general.

Los GPCRs perciben estímulos ambientales tales como fotones, olores y sabores. Sin embargo, son más de 360 los GPCRs no sensoriales, 200 de los cuales responden ante agonistas endógenos como aminoácidos transmisores, aminas biogénicas, péptidos reguladores, glicoproteínas, proteasas, nucleasas, fosfolípidos y ácidos grasos (Kristiansen, 2004; Pierce et al., 2002). Estos receptores participan en todos los aspectos de regulación fisiológica, incluyendo la inflamación, respuesta inmune y secreción tanto endocrina como exocrina, entre otros (Pierce et al., 2002). Estructuralmente, todos los miembros de esta familia tienen secuencias de aminoácidos similares y algunos residuos que se conservan entre todos ellos (Kristiansen, 2004). Poseen un extremo amino terminal extracelular, una cola carboxílica intracelular, siete dominios transmembrana compuestos por aminoácidos hidrofóbico que se organizan en  $\alpha$ -hélices, tres bucles extracelulares y tres intracelulares. Es por esto por lo que también son conocidos como receptores serpentina o heptahelicoidales. Las secuencias de los dominios transmembrana están muy conservadas entre los GPCRs, difiriendo en sus estructuras en bucle y en las colas extracelulares e intracelulares, las cuales varían considerablemente en longitud.

Los GPCRs se dividen en seis familias basándose en las similitudes de sus secuencias de aminoácidos, siendo idénticos más de un 20% de éstos en los dominios transmembrana (Kolakowski, 1994).

La mayoría de los receptores pancreáticos de secretagogos son proteínas transmembrana acopladas a proteínas G (Logston, 1994). En concreto, los GPCRs pertenecientes a la clase A, interactúan con los secretagogos de una forma no covalente a través de su dominio extracelular, y con las proteínas G a través de sus dominios intracelulares (Silvente-Poirot et al., 1998).

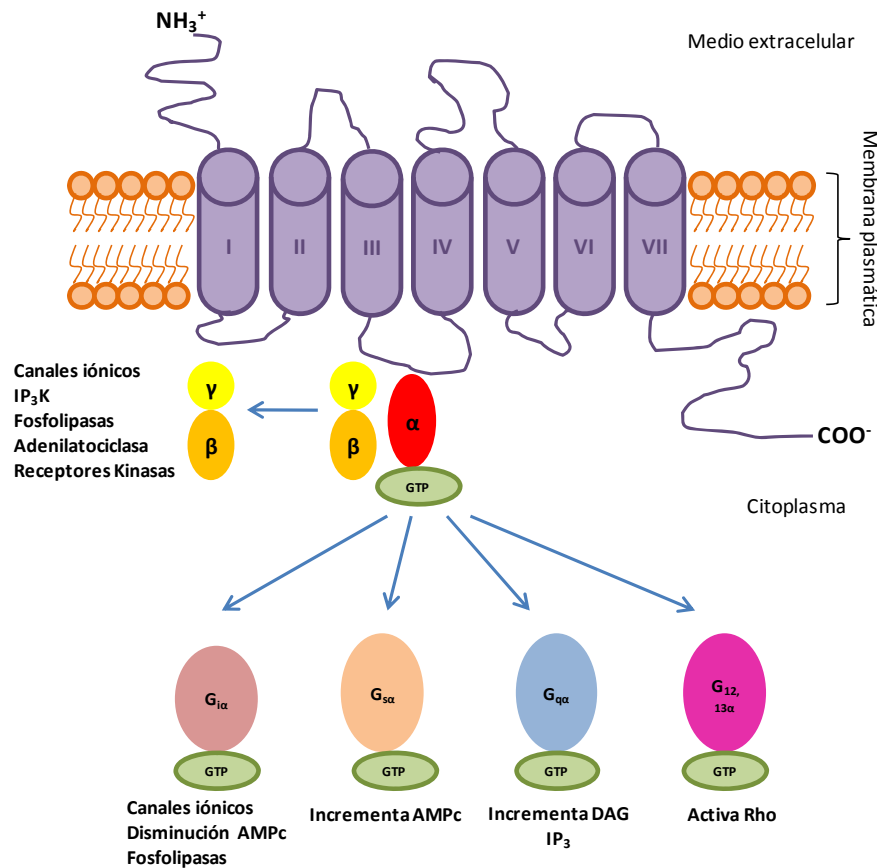
### ***Mecanismo de transducción de la señal***

Al unirse el secretagogo a su GPCRs, éste adopta una conformación que promueve la interacción con las proteínas heterotriméricas G, las cuales tienen un papel muy importante en este tipo de señalización. Estas proteínas G están formada por 3 subunidades: subunidad  $\alpha$  (39-45 KDa), subunidad  $\beta$  (35-39 KDa) y la subunidad  $\gamma$  (6-8 KDa). Actualmente se conocen 28 subunidades  $\alpha$ , 5  $\beta$  y 12  $\gamma$ , las cuales pueden asociarse con

diferentes combinaciones y proporcionar una mayor flexibilidad al proceso de transducción de la señal.

La proteína G heterotrimérica sigue una vía común de activación e inactivación tras la interacción del agonista con sus GPCRs. En estado de reposo la proteína G se encuentra con todas sus subunidades asociadas y unida a GDP, formando un heterotrímero inactivo. Al unirse el secretagogo (figura), el receptor sufre un cambio conformacional e incrementa la afinidad por la proteína G y actúa como factor intercambiador del nucleótido guanina para la proteína G, permitiendo la disociación de GDP y el reemplazo, casi inmediato, por guanosin trifosfato (GTP), el cual se encuentra en mayor concentración que el GDP, activando el complejo. La subunidad  $\alpha$  se disocia de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  y regulan a los efectores corriente abajo. La propia actividad GTPasa de la subunidad  $\alpha$  finaliza la activación y se vuelve a reasociar unida a GDP, con las  $G\beta\gamma$  para formar el heterotrímero correspondiente al estado de reposo (Johnson et al., 2006).

En base a sus similitudes estructurales, las proteínas  $G\alpha$  se pueden dividir en cuatro familias:  $G_s$  ( $G_s$ ,  $G_{olf}$ ),  $G_i$  ( $G_{i1-3}$ ,  $G_i$ ,  $G_g$ ,  $G_0$ ,  $G_z$ ),  $G_q$  ( $G_q$ ,  $G_{11}$ ,  $G_{14}$ ,  $G_{15/16}$ ) y  $G_{12}$  ( $G_{12}$ ,  $G_{13}$ ). Cada uno de estos cuatro subtipos regula a unos efectores en particular (Hampoelez and Knoblich, 2004). Así,  $G\alpha_s$  activa las adenil ciclasas, de la 1 a la 9, resultando en la formación 3'5'-adenosin monofosfato cíclico (AMPC), además de regular algunos canales de calcio. Por el contrario la  $G\alpha_i$  inhibe las adenil ciclasas 5 y 6, suprimiendo por tanto la generación de AMPC, además de controlar los canales de  $Ca^{2+}$  y  $K^+$ . La familia  $G\alpha_q$  activa la fosfolipasa  $C\beta_{1-4}$  (PLC $\beta$ ), que rompe la molécula de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) dando lugar a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP $_3$ ), que activan la protein cinasa C y movilizan los iones de  $Ca^{2+}$  desde los almacenes intracelulares, respectivamente. La subfamilia  $G_{12}$  regula a la subfamilia de proteínas Ras Rho y sus proteínas reguladoras GEFs. Las subunidades  $\beta\gamma$  contribuyen también a la regulación de estas vías además de tener otros efectos propios como la activación de la fosfolipasa  $A_2$  provocando la liberación de ácido araquidónico, o incluso contribuir en la activación de protein cinasas activadas por mitógenos, dependientes de proteínas Ras (MAPKs) (Clapham y Neer, 1997) (figura 4).



**Figura 4.** Esquema de la transducción de señal de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Al unirse el secretagogo al receptor se activa el complejo y la subunidad  $\alpha$  se disocia de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  quedando activadas y regulando a los efectores aguas abajo. Cada uno de los cuatro subtipos de  $\alpha$  regula a unos efectores en particular. Por su parte, las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  también tienen una función reguladora.

En el caso de la CCK, al unirse a su receptor provoca una activación de las proteínas G heterotriméricas de la familia  $G_q$ , especialmente  $G_q$  y  $G_{11}$ . A continuación, las subunidades de la proteína G y la subunidad  $\alpha$ , activan a la fosfolipasa C (PLC) que rompe la molécula de PIP2 en  $\text{IP}_3$  y DAG (Matozaki y Williams, 1989). El  $\text{IP}_3$  se une a sus receptores ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) presentes en la cara citoplasmática de la membrana del RE dando lugar a una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el interior del RE, y el DAG, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  activa a la protein cinasa C (PKC) (Williams, 2001). La activación de la PKC da lugar a una serie de fosforilaciones de diversas proteínas, lo que finalmente termina con la fusión del gránulo de zimógeno con la membrana plasmática apical y vertido del contenido del gránulo hacia el lumen acinar.

En los últimos años se ha demostrado que los receptores de CCK activan múltiples señales intracelulares que regulan otras vías no secretoras como la síntesis de proteínas, crecimiento y metabolismo (Gurda et al., 2008). Entre ellas, la activación del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Han y Logsdon, 2000; Satoh et al., 2004; Tando et al., 1999), o incluso la activación de casacas MAPK (Schafer et al., 1998).

## **El Calcio como Mensajero intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ )**

Para poder adaptarse a los cambios ambientales la célula necesita mecanismos de señalización intracelular. Esto requiere una serie de mensajeros intracelulares cuyas concentraciones varíen en el tiempo. Los iones calcio y fosfato son los encargados por excelencia de trazar dicha señalización, ya que poseen la capacidad de modificar tanto los campos electrostáticos como la conformación de las proteínas celulares, siendo herramientas universales para la transducción de señales (Burgoyne, 2007; Rizzuto and Pozzan, 2006) (Petersen, 2005).

A diferencia de los compuestos moleculares, el  $\text{Ca}^{2+}$  no puede ser alterado químicamente, por lo que para poder ejercer un control sobre él, la célula debe quelarlo, compartimentalizarlo o eliminarlo.

Los componentes quelantes por excelencia son el EGTA y el EDTA, que encierran al  $\text{Ca}^{2+}$  mediante un doblete de dos aminas y cuatro grupos carboxilos. En comparación con estos quelantes, en el caso de las proteínas especializadas en ligar  $\text{Ca}^{2+}$ , son los átomos de oxígeno de los grupos carboxilo y carbonilo (y a veces agua) los que coordinan dicha unión (Strynadka y James, 1989). Las proteínas de unión al calcio, poseen un dominio estructural de tipo hélice-bucle-hélice conocido como manecilla EF que consta de dos hélices alfa situadas perpendicularmente una a la otra y unidas por una pequeña región, de alrededor de 12 aminoácidos, que es por donde normalmente se unen a los iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Nakayama y Kretsinger, 1994).

Con respecto a la compartimentalización, la célula mantiene al  $\text{Ca}^{2+}$  secuestrado en varios compartimentos celulares, siendo el RE su principal almacén intracelular (Berridge et al., 2000). Existen estudios que proponen otros compartimentos como candidatos para una

liberación rápida de calcio, entre ellos se encuentran los endosomas, vesículas de Golgi (y acrosomas), lisosomas, gránulos secretores y melanosomas, que son compartimentos rodeados de una membrana simple con canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  y un gradiente electroquímico favorable desde el citoplasma (Rizzuto y Pozzan, 2006).

El ión  $\text{Ca}^{2+}$  es un mensajero intracelular que controla un amplio abanico de procesos celulares, entre los que se incluyen la contracción y la secreción, la transcripción génica y el crecimiento celular. Debido a su carga positiva, el calcio a menudo interviene en la translocación de proteínas desde citoplasma a la membrana. Esto es posible debido a la existencia en estas proteínas de un dominio C2, que es un segmento de aproximadamente 120 aminoácidos con 8 láminas beta antiparalelas conectadas por varios bucles (Cho y Stahelin, 2005). Al unirse dos o tres iones de  $\text{Ca}^{2+}$  a dicho dominio, se crea una subunidad con cierto potencial electrostático que acelera la asociación de las proteínas con aniones incrustados en la superficie citoplasmática de la membrana plasmática y de la membrana externa de las mitocondrias. Esta unión podría permitir la posterior penetración de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos en el interior de la bicapa lipídica. Por lo tanto, un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico iniciaría la translocación de dichas proteínas con dominios C2 hacia regiones específicas de la membrana donde se encontrarían con sus substratos. Un ejemplo sería la unión del calcio al dominio C2 de PKC (subtipos  $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma$ ), mediante la cual se inicia la translocación a la membrana de dicha cinasa, lugar donde se une al DAG y lo activa. La DAG Cinasa, sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  fosforila al DAG para producir ácido fosfatídico, mientras que la DAG lipasa convierte DAG en ácido araquidónico (AA), anfitrión de moléculas bioreactivas (Clapham, 2007). Otro esquema de orientación de la membrana dependiente de calcio es el empleado por las anexinas (Gerke et al., 2005).

En la mayoría de las células, el  $\text{Ca}^{2+}$  ejerce su principal acción cuando se eleva su concentración citosólica. Este incremento en la concentración, puede deberse a la liberación de este ión desde los depósitos intracelulares o a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de canales específicos en la membrana plasmática. En las células acinares pancreáticas en reposo, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) varía entre 50 y 200 nM. Estos niveles intracelulares tan bajos crean un gradiente de concentración debido al potencial intracelular negativo. Para mantener estos niveles citosólicos, la célula debe de contrarrestar la tendencia de entrada de este ion. Esto lo consigue mediante mecanismos de transporte basados en: el secuestro de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en compartimentos celulares (retículo

endoplasmático y mitocondria) y la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática. Como se explicará a continuación, los responsables son las bombas Calcio ATPasa del retículo sarco/endoplasmático (SERCA) y la calcio ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), respectivamente (Muallem et al., 1989).

### ***Mecanismos que mantienen la concentración basal de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico***

Existen dos mecanismos principales a través de los cuales la célula mantiene los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. Como anteriormente se ha comentado, uno es mediante la recaptación de calcio hacia el interior de los almacenes intracelulares y otro mediante la salida al exterior a través de la membrana plasmática.

Debido a que la concentración de calcio en el citoplasma es del orden de nanomolar y en el interior de los compartimentos intracelulares es del rango entre micro y milimolar, la recaptación de calcio hacia el interior de estos compartimentos se realiza en contra de su gradiente de concentración, por lo que este transporte requiere de un aporte de energía. Este transporte se realiza a través de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (Stojilkovic, 1998). Estas bombas ATPasas son del tipo P, sensibles a ortovanadato que se encuentran tanto en la membrana del retículo sarcoplásmico como en la del retículo endoplásmico (RE), y se conocen como bombas **SERCA** (Pozzan et al., 1994). Se cree que están reguladas por el mismo  $\text{Ca}^{2+}$ , de modo que un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  las activan y que un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre en el interior del retículo las inactivan (Petersen et al., 1994).

Con respecto a la eliminación del exceso de calcio citoplasmático a través de la membrana, se trata principalmente de **PMCA** (Petersen, 2005). Esta bomba se caracteriza por la formación de un intermediario fosforilado covalente y por ser inhibida por vanadato y lantano, además de compartir homología en la secuencia de aminoácidos con el resto de ATPasas de este tipo (Lajas et al., 2001; Strehler and Treiman, 2004). Se encuentra en todas las células de mamíferos y está multiregulada por varios mecanismos como  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, fosfolípidos ácidos como el  $\text{PIP}_2$ , proteína cinasa A y C, y proteasas como la calpaína “la última línea de defensa contra los altos niveles sostenidos de calcio” (Carafoli, 1994; Muallem, 1989).

En células excitables, además de estas PMCAs existen unos transportadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX, o SLC8A1-3), que intercambian un ion calcio por tres de  $\text{Na}^+$ . De modo que la alta



afinidad pero baja capacidad de las bombas PMCA y la baja afinidad pero alta capacidad de los transportadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  son complementarias, siendo bastante efectivas las PMCA en el mantenimiento de una baja  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en un período prolongado, mientras que NCX pueden hacer un rápido ajuste como el necesario durante la generación de potenciales de acción en la neurona (Hilgemann et al., 2006). En el caso de células no excitables, como son las células acinares pancreáticas, no parecen contribuir en gran medida dichos intercambiadores NCX, siendo las bombas PMCA el único mecanismo responsable para el mantenimiento de las bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, en situación de reposo, mediante la eliminación a través de la membrana plasmática (Pariente et al., 2003).

Puesto que la célula acinar carece de intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , es especialmente peligroso para estas células un fallo en el suministro de ATP, ya que no se podría movilizar el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático hacia el interior del RE mediante la bomba ATPasa SERCA, o hacia el exterior de la célula a través de la bomba ATPasa PMCA (Criddle et al., 2006).

### ***Mecanismos que aumentan la concentración de calcio citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ )***

Los niveles de calcio citosólico se pueden aumentar mediante la entrada de calcio extracelular o a través de la salida de calcio desde los compartimentos intracelulares. Centrándonos en la depleción del RE, en la membrana de este compartimento encontramos dos tipos de receptores, los mediados por inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) y los receptores de rianodina (RyR).

Los  $\text{IP}_3\text{R}$  están formados por tres dominios: un dominio amino-terminal, un dominio regulador con sitios de fosforilación y unión al ATP, y un dominio carboxi-terminal con seis regiones transmembrana (Taylor y Richardson, 1991). Al unirse el  $\text{IP}_3$  al extremo amino-terminal el receptor cambia su conformación y el canal se abre, permitiendo que el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado dentro del RE, en altas concentraciones, salga hacia el citoplasma (Bootman y Lipp, 2001). Aunque es totalmente necesaria la presencia de  $\text{IP}_3$  para que los  $\text{IP}_3\text{R}$  se abran, su activación está regulada por la concentración de calcio en de la superficie citosólica del canal, de modo que una baja  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  abre los canales permitiendo la salida de calcio, y como la mayoría de canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , una alta  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  alrededor de la boca del canal inhibe la salida con el fin de evitar una sobre carga del ión.

La depleción de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE estimula la apertura de los canales “store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry” (SOC) en la membrana plasmática. Estos canales permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior celular hacia el citosol, lo que favorece la restauración de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (Putney, 2005). Ferris y colaboradores (Ferris et al., 1991) observaron que el receptor podía ser fosforilado por PKC y proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina, proporcionando así un mecanismo de retroalimentación negativa. Estudios realizados en el páncreas exocrino demuestran que el pretratamiento con activadores de la PKC, como los esteres de forbol, no afecta a la hidrólisis del  $\text{PIP}_2$ , pero por el contrario, inhibe la liberación de calcio desde acinos permeabilizados (Willems et al., 1989). Además, el receptor puede ser fosforilado por una proteína cinasa A (PKA), disminuyendo la potencia del  $\text{IP}_3$  para liberar  $\text{Ca}^{2+}$  (Supattapone et al., 1988). El GMPc también puede influir en la función de estos receptores a través de la fosforilación del receptor por proteína cinasa G (PKG) (Rosado and Sage, 2002).

Los RyR son análogos a los  $\text{IP}_3\text{R}$ , tanto estructural como funcionalmente, aunque difieren en regulación, conductancia y perfil de expresión. Además del efecto modulador por parte del alcaloide de origen vegetal, rianodina, y de la cafeína, estos receptores se activan por el propio ion calcio (Bootman and Lipp, 2001; Cancela, 2001). Se ha visto, en células acinares pancreáticas, la producción de un pico de calcio de corta duración por acción del adenosinodinucleótido fosfato ribosa cíclico (ADPRc), y un bloqueo de éste en presencia de rianodina (Thorn et al., 1994), demostrando una acción de este intermediario sobre los RyR. De este modo, Pariente y colaboradores (Pariente et al., 2003) sugieren que la ADPRc puede regular endógenamente la señal de calcio, al estimular dichos receptores.

En el caso del ácido dinicotin-adenin-dinucleótido fosfato (NAADP), existen unos receptores específicos para este en células acinares pancreáticas, que tras su activación, producen un pico en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  a través de la sensibilización de sus receptores vecinos  $\text{IP}_3\text{R}$  y RyR (Cancela, 2001).

Además del RE existen otros almacenes intracelulares de calcio: lisosomas (vía NAADP) y gránulos de zimógeno (vía ADPRc) (Gerasimenko et al., 2006).

En ocasiones, esta liberación de calcio desde los almacenes intracelulares no es suficiente para una completa activación de los mecanismos celulares, por lo que es necesaria la entrada de calcio extracelular a través de la membrana plasmática. En células no excitables, la entrada de calcio mediada por voltaje es insignificante. El principal mecanismo en estas

células es a través de la familia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  SOCs, presentes en la membrana plasmática y que se abren en respuesta a una depleción activa (mediada por mensajero secundario) o pasiva (inhibición de la bomba SERCA) del RE (Parekh y Putney, 2005). Dentro de esta familia, se encuentran los canales  $I_{\text{CRAC}}$ , que son los que se encuentran más ampliamente distribuidos y mejor descritos. La entrada de calcio extracelular es tan importante como la liberación desde el RE para mantener la generación de señal, ya que esta entrada de calcio es necesaria para recargar el RE. Estos canales  $I_{\text{CRAC}}$  son altamente selectivos para el  $\text{Ca}^{2+}$ , y no solo son importantes en la recarga de estos almacenes, sino también en la producción de ATP, exocitosis y proliferación celular (Sutton et al., 2008). A través de estudios con RNA de interferencia, se ha demostrado la existencia de una molécula, STIM-1, que se extiende a lo largo de la membrana del RE, y que actúa como un sensor y al agotarse el  $\text{Ca}^{2+}$  del RE migra a unos determinados puntos debajo de la membrana plasmática provocando la apertura de los  $I_{\text{CRAC}}$ . Igualmente se ha descrito una regulación de este canal por parte de la mitocondria, produciendo una activación y una reducción de la inactivación dependiente de calcio (Moreau et al., 2006).

### ***Oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$***

Los secretagogos acetilcolina (ACh) y CCK, son los principales estimulantes de la cascada de señalización del calcio y reguladores de la secreción en las células acinares pancreáticas. Dependiendo de su concentración se producirá un determinado tipo de señal de calcio. Así pues, en presencia de concentraciones fisiológicas de CCK se pueden observar dos tipos principales de respuesta: una respuesta local continuada en el polo secretor de la célula, y una respuesta global, donde la señal se propaga a todo el citoplasma (Petersen y Tepikin, 2008). Por el contrario, concentraciones elevadas de secretagogo inician una respuesta consistente en un rápido incremento en la concentración de este ión debido a la liberación de los depósitos intracelulares, que disminuye progresivamente hasta un nivel estable o “plateau” que depende de la entrada extracelular de calcio (Criddle et al., 2004; Wasle and Edwardson, 2002).

Según estudios realizados en células acinares pancreáticas aisladas de ratón, cobaya y rata, la respuesta local de calcio a concentraciones fisiológicas de CCK, ceruleína y ACh consiste en una elevación no sostenida de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , oscilación repetitiva y de corta duración (Petersen, 2005; Petersen y Tepikin, 2008). En el caso de la ACh, estas oscilaciones se restringen al polo secretor de la célula mientras que la CCK se propaga por todo el citoplasma (Thorn et

al., 1993a). Cada una de estas oscilaciones está asociada con un impulso en la actividad secretora y liberación de zimógenos hacia el lumen (Maruyama y Petersen, 1994).

Cada oscilación o “espiga” es el resultado de liberaciones pulsátiles de  $\text{Ca}^{2+}$  desde sus almacenes intracelulares. Esta liberación inicial no depende extremadamente de la presencia de calcio extracelular, y se puede mantener algunos minutos en ausencia de éste. En cada oscilación se activan las bombas de calcio presentes en la membrana plasmática apical (PMCA), que aumentan las tasas de extrusión de calcio tan pronto como se incrementa los niveles basales de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . De hecho, estas bombas son capaces de bombear, en pocos minutos, todo el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado desde el RE, durante la estimulación con concentraciones máximas (es decir, fisiológicas) de secretagogo (Tepikin et al., 1992). Estas pérdidas se reponen mediante la entrada de calcio extracelular, mediado por el sensor STIM1, a través de los canales  $I_{\text{CRAC}}$ , (Petersen y Tepikin, 2008).

La explicación más sencilla a este fenómeno oscilatorio es que el periodo entre los picos o espigas, en el cual se aprecia una caída en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , representaría el periodo de llenado de los depósitos de calcio (Goldbeter et al., 1990). Se ha demostrado en estudios recientes que este aumento de calcio en el citoplasma está mediado por  $\text{IP}_3$  y otros mensajeros que liberan el ion tanto del RE como de sus almacenes ácidos presentes en el polo granular de la célula, a través de un bomba sensible a la bafilomicina (Gerasimenko et al., 2006).

En el caso de una estimulación prolongada con una concentración alta o suprafiológica (nM) de CCK se produce un aumento global y sostenido de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , entre 4 y 10 veces el valor de reposo, dependiente de la presencia de calcio extracelular. La dilatación en el tiempo de estos niveles citoplasmáticos de calcio se asocia a alteraciones en la función celular, como la activación del tripsinógeno en el interior de la célula (Kruger et al., 2000).

Se ha especulado mucho sobre el significado fisiológico de las oscilaciones de calcio. En otros tejidos se las ha relacionado con procesos tan dispares como secreción, aprendizaje y memoria (Berridge y Galione, 1988). En el páncreas exocrino, el significado de este fenómeno aún no se conoce con certeza. No obstante, las oscilaciones aparecen a concentraciones fisiológicas de agonistas, e incluso el análogo de la CCK, JMV-180, es capaz de estimular la secreción de amilasa provocando únicamente oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por estas razones, parece que estas oscilaciones juegan un papel importante en el control de la secreción hidroelectrolítica y enzimática en el páncreas exocrino (Yule y Williams, 1994).

### ***Señalización espacio-temporal***

En el páncreas esta señalización se genera mediante la acción de neurotransmisores y hormonas, fundamentalmente Ach y CCK (Petersen, 2005). Esta señalización de calcio se encuentra estrechamente relacionada con la secreción fisiológica de zimógenos inactivos desde el extremo apical de la célula acinar (Williams, 2001). La respuesta inducida por hormona o neurotransmisor está mediada por tres mensajeros intracelulares, IP<sub>3</sub>, ADPRc y NAADP (Yamasaki et al., 2005). Estos mensajeros generan un aumento oscilatorio en la concentración de calcio citoplasmático a través de la activación de los IP<sub>3</sub>R y RyR presentes en la membrana del RE.

El mecanismo de acción de la hormona CCK-8, tras una estimulación a concentraciones fisiológicas, se lleva a cabo principalmente a través de la producción de NAADP, el cual puede actuar sobre sus propios receptores específicos o modular los RyR; esta señal es amplificada, específicamente, por la acción del IP<sub>3</sub> (Galione and Petersen, 2005). Por el contrario, la Ach produce una respuesta mediada, por la activación de los IP<sub>3</sub>R (Petersen, 2005). Este aumento disparado de calcio por ambos agonistas, ocurre siempre en la zona apical de la célula acinar debido a la existencia de mitocondrias en la zona perigranular. Éstas constituyen una barrera que restringe la propagación de la señal fisiológica de calcio al polo apical de la célula mediante la captación de dicho calcio citosólico (Kirichok et al., 2004; Thorn et al., 1993b; Tinel et al., 1999).

El resultado exacto que tendrá este aumento de la [Ca<sup>2+</sup>] c en la función celular dependerá de las características espacio-temporales de la señal de calcio que se haya generado (Berridge, 2006).

### ***Ca<sup>2+</sup> y Mitocondria***

Las señales de calcio, afectan de forma crucial a la función mitocondrial. La liberación de este ión desde el RE y su posterior captación por la mitocondria resulta en una regulación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), producción de ATP, y muerte celular. De hecho se ha descrito que los niveles de calcio en la matriz mitocondrial tienen un papel esencial en el desarrollo de la apoptosis (Giorgi et al., 2008).

Existe un gradiente electroquímico entre el interior y el exterior de la mitocondria, creado por el transporte activo de protones (liberados desde el NADH oxidado), de -180 mV. La captación de Ca<sup>2+</sup> por la matriz mitocondrial implica la transferencia del ion tanto en la

membrana mitocondrial externa (MME) como en la membrana mitocondrial interna (MMI).

Para que la transferencia de calcio desde el RE hasta la mitocondria sea eficiente es necesario que los IP<sub>3</sub>R se dispongan muy cerca, a modo de sinapsis, de los lugares de captación de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial (Pinton et al., 2008). En estas zonas cercanas a la interacción RE-mitocondria existen en la MME unos canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC), esenciales para el flujo del Ca<sup>2+</sup> a través de esta membrana (Szabadkai et al., 2006). Pero no solo median el transporte calcio sino que también están implicados en el transporte de otros iones y metabolitos, incluyendo el ATP, por lo que juegan un papel esencial en la permeabilidad de la MME y, en consecuencia, en el desarrollo de la apoptosis, ya que si se produce un aumento en la permeabilidad de la MME se permitiría la liberación al citoplasma de factores apoptogénicos presentes en el espacio intermembrana (Shoshan-Barmatz et al., 2010; Tait and Green, 2010; Tsujimoto y Shimizu, 2002). El transporte a través de la MMI no está aun bien caracterizado, aunque se han encontrado tres tipos de canales altamente específicos para el Ca<sup>2+</sup>, los receptores MiCa (Kirichok et al., 2004), mCa1 y mCa2 (Michels et al., 2009). También se ha descubierto una proteína de unión al Ca<sup>2+</sup>, conocida como MICU, que parece ser esencial en la captación de Ca<sup>2+</sup> por la mitocondria (Perocchi et al., 2010).

Una vez dentro, en la matriz mitocondrial, el Ca<sup>2+</sup> estimula la producción de ATP mediante la regulación de las enzimas isocitrato deshidrogenasa,  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, y piruvato deshidrogenasa, tres deshidrogenasas del ciclo de Krebs (Carafoli, 2010). Este ATP se libera al citoplasma donde regula la actividad de proteínas sensibles al ATP que se encuentren cerca de la mitocondria. Existe una relación bidireccional entre el calcio liberado desde el RE y la producción de ATP, ya que tanto los canales SERCA como los IP<sub>3</sub>R son activados por ATP, permitiendo una regulación positiva entre el RE y la mitocondria cuando se da un incremento en la demanda energética (Hayashi et al., 2009).

Esta transferencia de calcio entre el RE y la mitocondria también está controlada por una serie de proteínas estructurales y reguladoras, entre las que se encuentran los miembros de la familia Bcl-2. La proteína Bcl-2 es el prototipo de una gran familia que incluye tanto proteínas anti como proapoptóticas. Los miembros antiapoptóticos pertenecientes a esta familia actúan sobre la homeostasis de Ca<sup>2+</sup> del RE mediante un mecanismo que aun no está muy claro, aunque sí se ha demostrado la unión de Bcl-2 a los IP<sub>3</sub>R (Lam et al., 1994),

produciendo una inhibición en la liberación de calcio a través de estos canales (Chen et al., 2004).

El calcio mitocondrial también regula otros procesos que tienen lugar dentro de la mitocondria tales como, oxidación de los ácidos grasos, metabolismo de los aminoácidos, y la actividad de la ATPasa F1, entre otros (Hayashi et al., 2009; Shoshan-Barmatz et al., 2010).

## **Línea celular AR42J**

Investigaciones recientes en Ciencias de la Nutrición están intentando elucidar los efectos de los lípidos de la dieta en la composición de las membranas celulares y su repercusión sobre la función celular. El cultivo celular parece ser una buena aproximación para investigar los aspectos moleculares de este asunto.

El trabajar con cultivos celulares permite una serie de ventajas que no tenemos en el modelo animal. Por ejemplo, se puede aplicar una gama mucho más amplia de modificaciones, además de permitirnos trabajar con un número más elevado de réplicas idénticas, superando con esto el gran problema de la heterogeneidad de las muestras, inherente a los animales de experimentación. Asimismo, las condiciones ambientales están mucho mejor controladas. Por último, existe una gran ventaja, y es que la adaptación de las membranas a los ácidos grasos presentes se logra en pocos días con el cultivo celular y no requiere de los largos periodos de tiempo que necesitan los animales de experimentación.

En nuestro caso, se optó por el uso de la línea de células acinares AR42J, que deriva de un tumor de páncreas exocrino de rata (Jessop, 1980). Es una línea celular estable, derivada de nódulos pancreáticos hiperplásicos de ratas macho, tras la administración de azaserina (Longnecker et al., 1979). Se puede mantener en cultivo continuo, y crece en el medio sintético formando racimos, en lugar de crecer en monocapa.

Las células AR42J contienen en su interior gránulos de zimógeno con cantidades significativas de enzimas digestivas como amilasa, y mantienen una similitud con las células acinares tanto en la síntesis como en la secreción de dichas enzimas digestivas (Dietrich, 1996).

Una de las principales características de estas células es que en su membrana mantienen la mayoría de los receptores de hormonas polipeptídicas presentes en un páncreas normal. Asimismo, los mecanismos de transducción son paralelos a los encontrados en las células pancreáticas normales (Simeone et al., 1995).

Es por esto por lo que estas células son ampliamente usadas en estudios de secreción, transducción de señales, funciones del citoesqueleto, apoptosis y respuesta del páncreas exocrino en modelos celulares de pancreatitis (Bozem et al., 2000; Feick et al., 1999; Hsu et al., 2003; Ikeda y Fukuoka, 2003; Satoh et al., 2005; Song et al., 2003; Yu et al., 2005a).

La diferencia entre las células AR42J y las células acinares normales es que las primeras están indiferenciadas y presentan una rápida proliferación. A nivel ultraestructural muestran pocos gránulos de secreción y un escaso retículo endoplasmático rugoso (RER), además de no presentar la típica polaridad característica en una célula secretora normal.

Este problema se solventa mediante la adición de hormonas polipeptídicas y esteroídicas, especialmente glucocorticoides, al medio de cultivo, ya que estas células son bastantes sensibles a estos compuestos. La incubación con glucocorticoides como la dexametasona provoca en ellas una mayor diferenciación morfológica (Logsdon et al., 1985).

Al comparar por microscopía electrónica de transmisión (TEM), una célula AR42J típica, cultivada en un medio intacto sin modificar, y otra cultivada durante 72 horas en presencia de dexametasona 100 nM, se ve como en las células tratadas los gránulos de zimógeno son mucho más prominentes tanto en número como en tamaño, y se aprecia un incremento en la cantidad de RER, que se muestra como grandes cisternas apiladas. Con esto se demuestra una inducción, por parte de la dexametasona, hacia un fenotipo exocrino similar al de una célula pancreática acinar de rata (Audi et al., 2007).

Estos cambios no son solo morfológicos. Las células diferenciadas con dexametasona presentan una inhibición del 75% de la replicación celular, muestran mayor número de receptores CCK, y experimentan un aumento en la síntesis de proteínas secretoras entre 5 y 10 veces mayor, especialmente en la síntesis de amilasa (Swarovsky et al., 1988; Wank et al., 1992).

Todo esto hace que actualmente esta línea celular sea la única disponible con la ventaja de manifestar muchas de las características de una célula acinar pancreática normal (Christophe, 1994; Masamune et al., 2001; Piiper et al., 2001).



La línea celular AR42J supone un modelo *in vitro* muy útil para el estudio de la pancreatitis aguda inducida por dosis supramáximas de ceruleína (Pandol et al., 2007; Satoh et al., 2004), por lo que, a través de esta línea celular, podemos estudiar los mecanismos celulares y moleculares del efecto de los lípidos dietéticos sobre la composición de la membrana y función celular, durante las etapas tempranas de la pancreatitis aguda.

## **Pancreatitis Aguda**

La pancreatitis aguda es una patología de carácter oxidativo-inflamatorio, de incidencia creciente en los países desarrollados (Forsmark, 2008), y con una mortalidad que puede alcanzar el 20-50 % (McKay y Buter, 2003). A pesar de todo ello, no existe una terapia específica que sea efectiva y reproducible para reducir la mortalidad y morbilidad que se deriva de ella.

Se caracteriza clínicamente por un fuerte dolor abdominal acompañado por un aumento en la concentración de enzimas pancreáticas en sangre u orina. Aunque por lo general tiene un curso benigno, puede evolucionar hacia una respuesta sistémica descontrolada con fracaso multiorgánico de consecuencias fatales. La pancreatitis aguda puede presentarse como un episodio aislado o episodios recurrentes.

Morfológicamente existe una graduación de lesiones en la pancreatitis aguda. En su forma leve, se puede reconocer una necrosis del tejido graso pancreático y edema intestinal y como regla general ausencia de necrosis pancreática. No obstante, esta forma leve puede desarrollarse hacia un estado grave cursando con necrosis parenquimal y hemorragia.

Tanto las funciones endocrinas como exocrinas del páncreas se ven dañadas.

La fisiopatología de la pancreatitis aguda es bastante desconocida. Se trata de una enfermedad multifactorial asociada con la activación prematura, intrapancreática, de zimógenos. De hecho, en algunos estudios se ha podido observar la presencia de enzimas digestivas pancreáticas, tales como fosfolipasas y proteasas, activadas dentro del parénquima pancreático, jugo pancreático y líquido ascítico de algunos pacientes con

pancreatitis aguda (Geokas y Rinderknecht, 1974; Ohlsson and Eddeland, 1975). Todo esto puede resultar en la autodigestión del órgano.

Los mecanismos y el lugar de inicio de la pancreatitis han sido un misterio perdurable. En un principio se creyó que la enfermedad se iniciaba en la región periductal debido a fugas del jugo pancreático desde los ductos pancreáticos (Foulis, 1980). Más tarde, la observación de grasa pancreática y peripancreática necrotizada en pacientes que habían muerto a causa de la enfermedad, dio pie a la hipótesis de que el acontecimiento inicial era la liberación de lipasa pancreática activa desde la célula acinar (Kloppel et al., 1986). En estudios posteriores llevados a cabo en modelos animales que simulaban la enfermedad en humanos, se sugirió la célula acinar como el lugar donde se iniciaban los daños morfológicos (Lerch et al., 1992).

En la actualidad, son muchos los estudios dedicados a investigar los episodios iniciales que tienen lugar en el interior de la célula acinar, ya que se ha llegado al consenso de que todos los acontecimientos que culminan en la enfermedad se inician en el interior de estas células, siendo por tanto, críticos en el desarrollo de la misma. Estos estudios se han llevado a cabo en diferentes modelos experimentales de pancreatitis, siendo el más usado el modelo por estimulación supramáxima con ceruleína.

### ***Modelo Experimental de Pancreatitis Aguda inducida por Ceruleína***

La pancreatitis inducida por ceruleína, análogo de la CCK, es el modelo de pancreatitis aguda que más se utiliza, ya que los aspectos bioquímicos, morfológicos y fisiopatológicos que muestra son similares a los de pancreatitis humana (Gukovsky et al., 1998; Willemer et al., 1992).

Lampel y colaboradores (1977) vieron que aumentando la dosis de CCK entre 10 y 20 veces por encima de la dosis de secreción máxima, se provocaba un daño pancreático caracterizado por: edema, incremento en las concentraciones séricas de enzimas pancreáticas, inflamación y necrosis (Lampel y Kern, 1977). A diferencia de la pancreatitis inducida en ratón por una dieta deficiente en colina y suplementada con etionina, o incluso el modelo inducido por infusión retrógrada de sales biliares, el modelo inducido por CCK no se caracteriza por una pancreatitis hemorrágica ni por provocar la muerte (Lombardi et al., 1975).

Así pues, dosis supramáximas de ceruleína o agonista colinérgico inducen este tipo de pancreatitis aguda tanto en ratas (Lampel and Kern, 1977), como en ratón (Niederau et al., 1985) y humanos sanos (Marsh et al., 1988). Cabe destacar que la ceruleína se emplea tanto en animal entero como en modelos celulares de pancreatitis aguda. En este último caso, además de las células acinares frescas está la opción de usar células AR42J.

Son muchos los estudios que usan las células AR42J en modelo celular de pancreatitis aguda ya que constituyen la única línea celular actualmente disponible que mantiene muchas características de las células pancreáticas normales, tales como síntesis y secreción de enzimas digestivas (Christophe, 1994).

### ***Aspectos más relevantes de la patogénesis del modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína.***

Como se ha comentado previamente, concentraciones de ceruleína mayores a las que producen una secreción pancreática máxima, de amilasa y lipasa, dan lugar a un proceso de pancreatitis aguda (Sato et al., 1989).

El modelo de pancreatitis se caracteriza, entre otros, por un bloqueo de la secreción pancreática; la colocalización de zimógenos y enzimas lisosomales, activación de tripsinógeno y otros zimógenos, y como consecuencia, daño en la célula acinar.

En respuesta a ese daño, la célula acinar induce la activación de mecanismos de señalización como la liberación de citocinas y quimocinas, en parte responsables de iniciar el proceso inflamatorio y favoreciendo la infiltración de células inflamatorias hacia el interior del tejido, pudiendo resultar en la muerte de la célula acinar (Gukovsky et al., 1998; Lerch and Adler, 1994; Willemer et al., 1992).

De este modo, los acontecimientos más relevantes que suceden en este modelo de pancreatitis aguda, son:

- Bloqueo de la secreción.
- Activación intracelular de zimógenos.
- Aumentos patológicos en las concentraciones de calcio citosólico.
- Generación de especies reactivas de oxígeno.

- Activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.
- Muerte celular: necrosis *versus* apoptosis.

### *Bloqueo de la secreción*

Aún manteniéndose intactos los procesos de síntesis y transporte, tanto de proteínas como de enzimas, se ha podido observar en los estados iniciales de la pancreatitis aguda, que la secreción de enzimas digestivas en la célula acinar se encuentra bloqueada (Saluja et al., 1985). Esta retención intracelular de los gránulos de zimógeno se puede deber a una alteración de la red apical de filamentos de actina o bien a una alteración en los procesos íntimos de la exocitosis relacionados con las proteínas SNARE (Jungermann et al., 1995; Pandol et al., 2007).

Según Saluja y colaboradores (1989), el bloqueo de la secreción, en este modelo de pancreatitis aguda, parece estar mediados por el estado de baja afinidad de los receptores CCK presentes en la célula acinar. A conclusiones similares llegaron Matozaki y colaboradores (1989) mediante el uso de CCK-JMV-180, el cual puede actuar como un agonista en el estado de alta afinidad de los receptores de CCK pero como un antagonista en el estado de baja afinidad.

Esta inhibición de la secreción es un hecho importante en el inicio del daño de la célula acinar.

### *Activación intracelular de zimógenos*

La célula acinar sintetiza una gran cantidad de enzimas digestivas. Estas enzimas, como se comentó anteriormente, con el fin de evitar la autodigestión de la glándula, son en la mayoría sintetizadas y almacenadas dentro de la célula en forma de precursores inactivos, conocidos como zimógenos. En el intestino delgado, unas enteroquinasas específicas rompen el zimógeno tripsinógeno para dar lugar a la tripsina, forma ya activada, y es esta tripsina la encargada de activar el resto de zimógenos pancreáticos. De modo que estos zimógenos, en condiciones fisiológicas son activados en el intestino delgado. En condiciones normales, puede ocurrir la activación dentro de la célula de una pequeña cantidad de estos zimógenos, pero la existencia de mecanismo protectores intracelulares, tales como, la presencia de inhibidores de tripsina y proteasas en los gránulos de zimógeno, además de unas condiciones de pH no óptimas, evitan el daño celular.

En condiciones de estimulación supramáxima con ceruleína, se ha podido observar en rata una activación intracelular de tripsinógeno y otros zimógenos pancreáticos (Grady et al., 1996; Luthen et al., 1995). La actividad de la tripsina se pudo detectar a los 10 minutos tras la estimulación (Mithofer et al., 1998), mientras que otros marcadores de pancreatitis como el edema pancreático o la hiperamilasemia, se observaron a los 30 min (Grady et al., 1996). Esta secuencia revela la activación de zimógenos como la causa y no como el resultado de la pancreatitis. Tanto la activación de zimógenos, como el daño celular, no tienen lugar a concentraciones inferiores a  $10^{-10}$ M de CCK o ceruleína, ni pretratando las células acinares con inhibidores de proteasas intracelulares antes de la estimulación supramáxima (Grady et al., 1998; Saluja et al., 1999).

Existen varias hipótesis sobre cómo se produce esta activación. Una de ellas es la hipótesis de la colocalización basada en que como la secreción se encuentra bloqueada pero la síntesis continúa activa, se produce una acumulación progresiva de zimógenos. Esta acumulación finalmente concluye en la aproximación y fusión entre gránulos de zimógeno y lisosomas en un proceso denominado colocalización, siendo activados dichos zimógenos por enzimas lisosomales tales como la catepsina B (Pandol et al., 2007; Sierra and Torres, 1999).

La activación intracelular de estos zimógenos produce un daño celular que puede resultar en la muerte de la célula acinar.

### *Aumentos patológicos en las concentraciones de calcio citosólico*

Muchos procesos dañinos en la célula acinar son dependientes de elevaciones globales y sostenidas del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, entre ellos la formación de vacuolas endocíticas y la activación prematura del tripsinógeno, así como la activación del factor  $\text{NF}\kappa\text{B}$  y subsiguiente expresión de citocinas (Petersen et al., 2009; Raraty et al., 2000).

Son varios los estudios que demuestran una participación del calcio en la patogénesis de la pancreatitis (Fernandez-del Castillo et al., 1991; Mithofer et al., 1995). De este modo, se ha podido observar en modelos de pancreatitis inducida por ceruleína, la existencia de alteraciones en la homeostasis de calcio en un estadio muy temprano de la enfermedad (Ward et al., 1996).

Una supraestimulación con CCK produce una elevación sostenida de  $[Ca^{2+}]_c$  dependiente de calcio extracelular y que produce una activación de la tripsina en el polo apical de la célula (Kruger et al., 2000).

Este aumento en la  $[Ca^{2+}]_c$ , podría también desencadenar una producción excesiva de ATP, lo que supondría una mayor reducción de oxígeno a agua y la obtención de una mayor cantidad de electrones libres que resultan en la formación de superóxidos. Estos iones resultantes del oxígeno, los radicales libres y peróxidos se conocen comúnmente como ERO, que cuando se liberan al citoplasma activan una serie de proteasas (caspasas, catepsinas) y otras moléculas que coreografían la muerte celular.

También interviene el  $Ca^{2+}$  en el proceso de apoptosis, ya que la asociación de la anexina I con la fosfatidil serina (PS) presente en la cara citoplasmática de la membrana y su posterior “flipping” a la cara extracelular, quedando de este modo la célula marcada para ser eliminada, es dependiente de  $Ca^{2+}$  (Gerke et al., 2005). Además está la relación antes mencionada entre el  $Ca^{2+}$  y la mitocondria, y a su vez, entre ésta y la apoptosis.

### *Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO)*

Aunque no constituyen por sí mismas un factor desencadenante, las ERO se han convertido en los últimos años en uno de los mediadores clave de la patogénesis y progreso de la pancreatitis aguda (Babu et al., 2009; Jung et al., 2010). Se ha demostrado que la ceruleína da lugar a la generación de ERO en modelos celulares de pancreatitis en un proceso mediado por NADPH oxidasa y dependiente de  $Ca^{2+}$  (Yu et al., 2007). Cuando la producción de ERO supera a los mecanismos de defensa antioxidante, como ocurre en la pancreatitis aguda, estas moléculas van a causar graves alteraciones funcionales y bioquímicas como: ataque oxidativo a proteínas y ADN (Reinheckel et al., 1999), peroxidación de lípidos de membrana (Yagci et al., 2004); liberación de  $Ca^{2+}$  de distintos almacenes intracelulares, como muestran nuestros propios trabajos (Martínez-Burgos et al., 2006); desorganización del citoesqueleto (EROado et al., 2002); y activación de factores de transcripción implicados en la inducción de la síntesis de factores inflamatorios, como NF- $\kappa$ B (Yu et al., 2005a).

### *Activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B*

La activación de NF- $\kappa$ B en las células acinares por hiperestimulación con CCK o ceruleína es muy rápida, produciéndose en apenas 5 minutos tras la aplicación de esta sustancia

(Gukovsky et al., 1998) y parece estar mediada de forma independiente por  $\text{Ca}^{2+}$  (Sutton et al., 2008) y por ERO (Yu et al., 2002). Con respecto a la relación entre la activación de NF- $\kappa$ B y la activación intracelular del tripsinógeno, aunque ocurren simultáneamente se cree que son hechos independientes (Hietaranta et al., 2001). Posiblemente la activación del tripsinógeno iniciaría el daño celular en la pancreatitis, y la activación de NF- $\kappa$ B, con la producción de citocinas y reclutamiento de distintos tipos de células inflamatorias, causaría la continuación y propagación del daño.

Se ha demostrado mediante experimentos *in vivo* e *in vitro* que esta activación se produce a través de la degradación de I $\kappa$ B (Han and Logsdon, 2000; Satoh et al., 2004).

En todo este proceso de activación del NF- $\kappa$ B por ceruleína, se ha visto que la protein cinasa C (PKC), en concreto las isoformas PKC $\epsilon$  y PKC $\delta$ , tienen un papel regulador, clave, en dicha activación (Satoh et al., 2004).

Una reacción crucial es la activación de las isoformas de la familia de fosfolipasas C (PLC)  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , por ceruleína. Estas PLCs catalizan la hidrólisis del IP $_2$  obteniendo los mensajeros intracelulares IP $_3$  y DAG. El IP $_3$  promueve la liberación de calcio desde sus almacenes intracelulares (Mikoshiya, 1997), y el DAG activa una serie de factores, destacando entre ellos, la activación de las isoformas PKC $\epsilon$  y PKC $\delta$  de la familia PKC (Nishizuka, 1992), las cuales inducen una rápida fosforilación tanto de proteínas citosólicas como de las unidas a la membrana, activando al NF- $\kappa$ B mediante la degradación de las proteínas I $\kappa$ B (Satoh et al., 2004). Una característica de estas isoformas es que además de presentar un dominio catalítico altamente conservado tienen un dominio autoinhibidor que las mantiene inactivas en ausencia de segundos mensajeros activadores.

Se ha identificado en estudios recientes sobre pancreatitis, un punto convergente novel en la vía de señalización de PKC $\epsilon$  y PKC $\delta$ , la protein cinasa D (PKD), en concreto la PKD1, que pertenece a una nueva familia de serin treonin protein cinasas (Yuan et al., 2008). Son muchos los estudios que demuestran que la PKD1 actúa como mediador en la activación del NF- $\kappa$ B, en una gran variedad de células que estén expuestas a agonistas de GPCRs o estrés oxidativo (Song et al., 2009; Storz et al., 2004; Storz and Toker, 2003).

Pero no solo las PKCs están implicadas en este proceso. Tando y colaboradores (1999) demostró la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en la activación del NF- $\kappa$ B por ceruleína, en células acinares de rata. Al tratar las células con un quelante de calcio intracelular, vio que se producía una disminución de la degradación de I $\kappa$ B. Esto se podía deber, bien a la

inhibición de la PKC o a la de una proteína fosfatasa dependiente de calmodulina, sugiriendo una similitud entre los mecanismos por los que la ceruleína induce la activación del NF- $\kappa$ B y los de la secreción de enzimas digestivas ya que ambos requieren una movilización de calcio y una activación de proteínas cinasas.

Otro aspecto importante que se debe enfatizar es la implicación de ERO en la activación del NF- $\kappa$ B a través de la estimulación con ceruleína (Yu et al., 2005a). Estudios realizados en células AR42J han demostrado que la ceruleína da lugar a grandes aumentos en la producción de ERO, que a su vez activan factores de transcripción sensibles al estado oxidativo, como es el caso del NF- $\kappa$ B. De este modo se induce la síntesis y secreción de citocinas en un medio ausente de células inflamatorias (Yu et al., 2002). Además, se ha comprobado que la adición de antioxidantes al medio de cultivo, inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias mediante la supresión de la activación del NF- $\kappa$ B (Yu et al., 2005a).

#### *Muerte celular: necrosis versus apoptosis.*

La gravedad de la pancreatitis aguda está directamente relacionada con el grado de necrosis e inversamente relacionada con el grado de apoptosis (Bhatia, 2004; Mareninova et al., 2006). Aunque los determinantes, naturaleza y extensión del balance entre apoptosis/necrosis no están claros, la mitocondria juega un papel crucial en el mismo. Una elevación moderada en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en citosol y otras señales de estrés inducen la liberación del citocromo C desde la membrana mitocondrial interna y la activación de caspasas. Estos acontecimientos están controlados por las proteínas-canales Bax/Bak. Por el contrario, un estrés más fuerte, como por ejemplo una gran sobrecarga citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  o una generación excesiva de ERO se asocian a colapso del potencial de membrana mitocondrial (con apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial), inhibición de la producción de ATP, inhibición de caspasas y muerte por necrosis (Booth et al., 2010; Odínokova et al., 2008).

La ceruleína aumenta la producción de ERO y produce aumentos sostenidos de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células pancreáticas acinares, AR42J. La producción de ERO, en el curso de la pancreatitis, puede estar mediada también por NADPH oxidasa de manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual puede inducir apoptosis en la célula pancreática acinar. Se piensa que la inhibición de esta enzima y el tamponamiento del calcio citosólico puede aliviar la apoptosis reprimiendo la



expresión de genes asociados a apoptosis y disminuyendo la actividad de la caspasa 3 (Yu et al., 2005a).

## **Inflamación y Pancreatitis Aguda**

La pancreatitis aguda es una enfermedad inflamatoria. Esta inflamación no afecta solo a la patogénesis de la enfermedad sino también al curso de la enfermedad. Actualmente se reconoce la activación intracelular de enzimas digestivas como el acontecimiento inicial crítico que provoca la autodigestión del páncreas (Bhatia et al., 2000; Bhatia and Moochhala, 2004; Bhatia et al., 2005).

Este daño celular desencadena una reacción inflamatoria local. Son varios los estudios que demuestran que las propias células acinares pueden actuar como fuente de citocinas y modificar el curso de la pancreatitis. Por ejemplo, Bhatia y colaboradores (2002) vieron una producción de mediadores inflamatorios, en concreto quimocinas, por parte de la propia célula acinar, en un modelo de pancreatitis aguda provocada por dosis supramáximas de ceruleína. También se ha demostrado que, además de tener receptores específicos para el TNF- $\alpha$ , las células acinares pueden producirlo y secretarlo (Gukovskaya et al., 1997).

Estas citocinas tienen un papel clave, no solo en la fisiopatología de la enfermedad sino en el desarrollo de la subsiguiente respuesta inflamatoria, ya que pueden activar y atraer células inflamatorias como neutrófilos y macrófagos hacia el interior del páncreas que contribuyen a un daño mayor (Grady et al., 1997).

Son varios los factores de transcripción que se activan tempranamente en la pancreatitis y que inducen la síntesis y liberación de varias citocinas y quimocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , mob-1, quimocina KC y la proteína inflamatoria-2 de macrófagos (MIP-2) entre otras (Han and Logsdon, 1999; Yu et al., 2002). Uno de esos factores de transcripción es el factor nuclear-kB (NF-kB), un regulador clave en la producción de citocinas proinflamatorias, quimocinas, receptores inmunológicos, y otras moléculas inflamatorias (Pandol, 2006; Vaquero et al., 2001).

El NF- $\kappa$ B se activa por estímulos que van desde factores físicos que dañan a la célula hasta virus pasando por mitógenos (MAP cinasas) y citocinas. En concreto, se ha visto en un modelo *in vivo* de pancreatitis inducida por ceruleína, una fuerte y rápida activación de dicho factor, observando después un aumento en la expresión del ARNm de las IL-6 e IL-8 de hasta 100 veces mayor, así como disminución en la transcripción de estas citocinas cuando se bloquea la activación de dicho factor. Estos resultados juntos con otros estudios, ponen de manifiesto la participación del NF- $\kappa$ B en el aumento de la síntesis de citocinas por ceruleína (Gukovsky et al., 1998), por lo tanto, en la patogénesis de la enfermedad (Long et al., 2009).

Las citocinas, especialmente las citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6 producidas por las propias células acinares pancreáticas podrían tener un papel fundamental en la patología de la enfermedad (Bhatia et al., 2000; Yu et al., 2005b). Esta capacidad de secreción se ha determinado en estudios anteriores mediante análisis semicuantitativo de la expresión de ARNm (Norman et al., 1995; Vaquero et al., 2001), o por la determinación de citocinas presentes en el medio de cultivo tras estimular las células acinares (Gukovskaya et al., 1997).

## ***Mediadores Inflamatorios***

### ***Interleucina-1 $\beta$***

La IL-1 $\beta$  es una molécula de naturaleza glicoprotéica. Se sintetiza en forma de precursor inactivo de 31 KDa, pro IL-1  $\beta$ , el cual requiere de una escisión intracelular por una cisteína proteasa para pasar a su forma activa. Es la única citocina que presenta actividad únicamente en su forma madura (Dinarello, 1996; Nerad et al., 1992).

Los principales productores de IL-1 $\beta$  son los macrófagos, jugando un papel muy importante en la secreción de dicha citocina el estado de diferenciación de éstos (Pirhonen et al., 1999). También se sintetiza en neutrófilos, linfocitos T y B, queratinocitos, células de cerebro de rata, microglías, células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales y células de riñón (Dinarello, 1994). Asimismo se ha detectado la presencia de IL-1 $\beta$  en el sobrenadante de células AR42J en cultivo (Long et al., 2009).

La secreción de IL-1 $\beta$  en la pancreatitis aguda, produce principalmente activación de los neutrófilos (Fink and Norman, 1997).

En condiciones normales, en el páncreas no se detectan ni el ARNm de la IL-1 $\beta$  ni su proteína asociada. Sin embargo, según lo obtenido en un modelo de pancreatitis aguda, una vez que comienza la cascada de destrucción de la célula acinar y liberación de enzimas, es cuando este mensajero se hace rápidamente evidente, y se observa un aumento progresivo en las concentraciones de esta citocina en el suero (Norman et al., 1994).

La producción de IL-1 $\beta$  en el interior del páncreas ocurre de una forma predecible independiente al modelo de pancreatitis aguda (Fink and Norman, 1997). De hecho, a nivel intrapancreático, es detectable al cabo de 1 hora de haber inducido la pancreatitis y sus niveles aumentan rápidamente durante las 6 horas siguientes. Junto con el TNF- $\alpha$ , tienen un papel muy importante en el desarrollo y progresión de la pancreatitis aguda (Fink and Norman, 1997). Así, se ha visto que bloqueando los receptores de IL-1 $\beta$ , antes o inmediatamente después de inducir la pancreatitis se produce una disminución en la gravedad de la enfermedad y se reduce el daño pancreático intrínseco (Hughes et al., 1996).

A diferencia del TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  no es la causa directa del daño pancreático. Se usa como un biomarcador de la gravedad de la enfermedad (Denham et al., 1998), con un grado de exactitud similar a la de la IL-6 en predecir la gravedad (82% vs 88%) (Malleo et al., 2007).

### *Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$*

Es una proteína pleiotrópica que se expresa en la célula acinar y un regulador clave de otras citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión de leucocitos que actúa como un activador de células inmunes en la pancreatitis aguda (Papachristou et al., 2007). Está relacionado con la apoptosis a través de la vía de receptores TRAILs.

Se sintetiza como una proteína monomérica transmembrana de 26 KDa y, posteriormente, se convierte en una proteína soluble de 17 KDa, gracias a la acción de una enzima proteolítica. Ambas formas poseen efectos metabólicos. Existen para este factor dos receptores biológicamente activos: el receptor 1 (TNFR1) y el receptor 2 del (TNFR2).

Desafortunadamente no existen muchos datos relacionados con el mecanismo celular y molecular del TNF $\alpha$  en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en la pancreatitis aguda. Lo que está claro es que tiene un papel fundamental en la progresión sistémica de la enfermedad (Vaquero et al., 2001). Un ejemplo sería el estudio realizado por Hughes y

colaboradores (1996) donde vieron como neutralizando el TNF- $\alpha$  con un anticuerpo policlonal se reducía significativamente la gravedad de la pancreatitis en ratas.

El TNF- $\alpha$  tiene un papel esencial en la pancreatitis aguda. Es una citocina clave en el inicio de la cascada de inflamación que tiene lugar en esta enfermedad (Cosen-Binker y Gaisano, 2007; Pereda et al., 2006) produciendo una inducción de la expresión de genes proinflamatorios como el de la IL-6 (Zhou et al., 2003).

### *Interleucina-6*

Es una proteína de 185 aminoácidos que se unen entre sí, formando un paquete de 4  $\alpha$ -hélice, con un peso molecular de 2-28 KDa, en función de que se encuentre en un estado de glicosilación o fosforilación.

Es producida por múltiples células como monocitos/macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células del músculo liso, entre otras, en respuesta a la estimulación por endotoxinas, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Bhatia et al., 2000). También se sintetiza por células acinares estimuladas con dosis supramáximas de ceruleina (Bhatia et al., 2002; Yu et al., 2002).

Se produce en la fase aguda de la pancreatitis y se secreta al suero para mediar la respuesta inflamatoria mediante la unión a sus receptores alpha. Se le considera una citocina proinflamatoria por inducir tanto el crecimiento y diferenciación de células B y la activación de las T, como la estimulación de la hematopoyesis, la diferenciación de los macrófagos y células dendríticas y el reclutamiento leucocitario. Además estimula la síntesis de citocinas proinflamatorias como la MCP-1 (marcador quimioatractivo de macrófagos de tipo 1) (Hoene and Weigert, 2008). Es un pirógeno endógeno que estimula en la hipófisis la producción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La sobreexpresión de IL-6 en ratones transgénicos, los hizo más propensos a la pancreatitis aguda (Suzuki et al., 2000b).

Se han correlacionado las concentraciones de IL-6 en suero de pacientes con pancreatitis aguda con la gravedad de la enfermedad (Leser et al., 1991), habiéndose consolidado dicha interleucina como un indicador de la gravedad de la pancreatitis aguda.

### *Interleucina-10*

La IL-10 es una potente citocina anti-inflamatoria. Fue descrita originalmente en estudios sobre la naturaleza e identificación de una molécula en el sobrenadante de linfocitos Th2 con actividad inhibidora de las funciones de células Th1. La IL-10 inhibía la expresión de

citocinas por macrófagos y por células Th1, así como la presentación de antígenos (Mayer et al., 2010).

La clonación de la IL-10 ha permitido una mejor caracterización de la citocina recombinante, mostrando múltiples actividades además de las ya mencionadas, que incluyen estimulación de la proliferación de mastocitos y células B, secreción de anticuerpos y expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II (Tsukamoto, 1998).

El resultado de la pancreatitis aguda, como enfermedad inflamatoria, depende del balance entre los niveles de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Dignam et al., 1983; Norman, 1998). Concretamente, en células AR42J estimuladas con TNF- $\alpha$  se ha demostrado un aumento en la producción de IL-10, junto con un incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias (Robinson et al., 2006).

La vía de señalización de la IL-10 por la cual provoca su efecto antiinflamatorio comienza con la interacción de la IL-10 con su receptor. Esto induce la activación de las proteínas JAKs que activan los factores de transcripción STAT1, -3 y -5 mediante su fosforilación y se traslocan al núcleo, donde activarán la expresión de varios genes (Leonard and O'Shea, 1998), la mayoría relacionados con la supresión de las vías de señalización de las citocinas proinflamatorias. En células AR42J, la IL-10 también interfiere con el NF- $\kappa$ B, bloqueando la translocación al núcleo (Wang et al., 1995) y su posterior unión al DNA (Driessler et al., 2004).

Se piensa que esta interleucina tiene un papel protector en la pancreatitis aguda (Rongione et al., 1997).

### *Factor Nuclear- $\kappa$ B*

El NF- $\kappa$ B pertenece a la familia Rel de proteínas de regulación transcripcional, que comprende 5 miembros: p50, p52, p65, Rel B y c-Rel (Sen y Baltimore, 1986). Los cinco miembros de esta familia comparten un extremo N-terminal de 300 aminoácidos aproximadamente, denominado dominio de homología Rel (RHD) que media su unión al DNA, dimerización y translocación nuclear.

Una característica de los miembros de esta familia es la necesidad de crear dímeros entre ellos para poder unirse al DNA. Se pueden crear múltiples combinaciones de homodímeros y heterodímeros que se unen a la secuencia consenso  $\kappa$ B en los elementos promotores de

los genes regulados por NF- $\kappa$ B, dando por resultado un único patrón de activación transcripcional (Dejardin et al., 2002; Sacconi et al., 2003; Zhong et al., 2002). El heterodímero p65-p50 se define como la forma clásica de unión al DNA, aunque no es la única de las múltiples especies que se pueden unir a los sitios  $\kappa$ B.

En células no estimuladas, el NF- $\kappa$ B se encuentra silenciado en el citoplasma mediante la asociación con una familia de proteínas inhibitoras conocidas como I $\kappa$ B, que engloba a I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  e I $\kappa$ B $\gamma$  (Ghosh and Karin, 2002; Silverman y Maniatis, 2001). El complejo I $\kappa$ B $\alpha$ -p50-65 se encuentra por tanto en el citoplasma en condiciones normales hasta que un amplio rango de estímulos, incluidos citocinas, quimosinas, productos bacterianos y virales, radiación UV y ERO activan esta vía mediante la fosforilación de las proteínas I $\kappa$ B por la I $\kappa$ B cinasas (IKKs) (Granger and Remick, 2005; Long et al., 2005). El complejo IKK está formado principalmente por tres cinasas,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . A IKK $\gamma$  se le conoce también con el nombre de NEMO (NF-B esencial modulador) ya que se le ha considerado regulador de las otras IKKs. NEMO es crítico en la activación proinflamatoria del complejo IKK (figura 5) (Bonizzi and Karin, 2004; Dai et al., 2004).

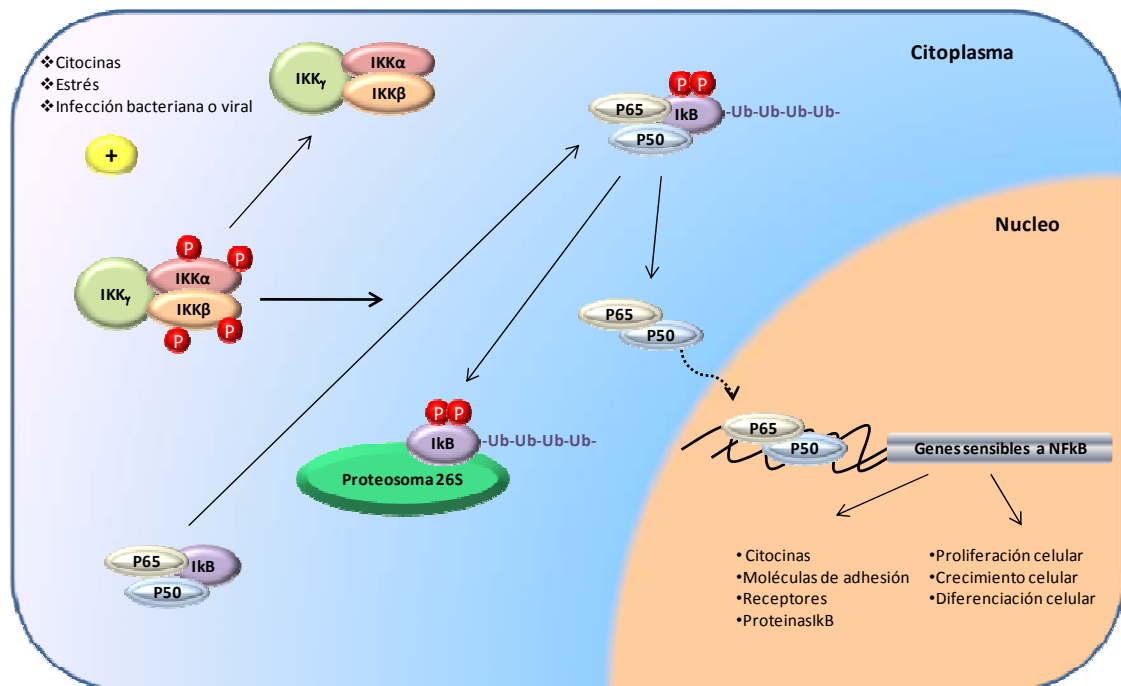


Figura 5. Esquema de la activación del NF- $\kappa$ B y su translocación al núcleo.

La activación del complejo IKK por la gran variedad de factores anteriormente comentados se basa en la fosforilación de residuos específicos de serina en el bucle de activación de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ . Una vez activado, fosforila a las proteínas I $\kappa$ B. Esta fosforilación provoca la unión de estas proteínas I $\kappa$ B con un complejo que las poliubiquitina y las marca para que el proteosoma las degrade. De este modo el NF- $\kappa$ B queda libre y se trasloca al núcleo y se une al DNA (Karin and Ben-Neriah, 2000).

Una vez unido al DNA activa la transcripción de genes como los de varias citocinas, quimosinas, moléculas de adhesión, receptores, proteínas I $\kappa$ B, incluso genes relacionados con la proliferación, el crecimiento y la diferenciación celular. Varios de los productos de estos genes como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  también activan directamente la vía del NF- $\kappa$ B, estableciendo un bucle positivo de autoregulación que amplifica y aumenta la duración de la respuesta inflamatoria (Yamamoto y Gaynor, 2004).

Se ha demostrado su implicación en muchas enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) (Tak y Firestein, 2001). El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción esencial con un papel muy importante en la fisiopatología de la pancreatitis aguda (Rakonczay et al., 2008).

## **Mecanismos de Muerte Celular en la Pancreatitis Aguda**

La inflamación y la muerte de la célula acinar pancreática son el sello tanto de la pancreatitis humana como experimental (Cohen y Cohen, 1996).

El estudio de las diferentes vías efectoras y reguladoras de los procesos de apoptosis y necrosis, en relación al papel que desempeñan en diversas enfermedades y condiciones patológicas, incluyendo la pancreatitis aguda, ha alcanzado gran interés en las últimas décadas.

## ***Apoptosis***

Se trata de un proceso altamente coordinado y arbitrado tanto por mecanismo intrínsecos como factores extrínsecos (Johnstone et al., 2002; Padanilam, 2003).

Se caracteriza por una serie de inconfundibles cambios morfológicos y bioquímicos entre los se destacan la redistribución de la fosfatidilserina en la membrana celular, orientándose hacia la cara externa, la contracción del citoplasma y núcleo, condensación y posterior fragmentación de la cromatina, y descomposición de la célula en múltiples cuerpo esféricos que mantienen la integridad de la membrana, lo que impide el escape al espacio extracelular del contenido intracelular, resultando un proceso "silencioso" sin inflamación (Cory y Adams, 2002). Las moléculas ejecutoras y responsables por excelencia de la mayoría de estos cambios que tienen lugar en la apoptosis son una familia de cistein-aspartasas conocidas como caspasas.

Todas las caspasas se sintetizan como proenzimas que requieren de un procesamiento proteolítico para pasar a su forma activa (Strasser et al., 2000; Tibbetts et al., 2003). Hasta el momento, se han identificado 14 cisteín-proteasas, desde la caspasa-1 hasta la caspasa-14 (Tibbetts et al., 2003).

Funcionalmente la familia de caspasas se puede dividir en dos subfamilias. Las caspasas -1, -4 y -5 se relacionan con la maduración de citocinas como la IL-1 y la IL-18, y las funciones proinflamatorias. Los otros miembros de la familia forman parte de la vía apoptótica. Aparte de esta clasificación general, las caspasas se pueden clasificar en dos tipos según su papel en las diversas cascadas de señalización intracelular en las que intervienen. Así pues, se puede hablar de caspasas iniciadoras (caspasas -2, -8, -9, y -10) y de caspasas efectoras o "ejecutoras" (caspasas -3, -6, y -7) (Strasser et al., 2000). Cuando la célula recibe un estímulo apoptótico, se lleva a cabo la activación proteolítica de las caspasas iniciadoras y éstas a su vez activan a las efectoras (Green, 2003).

Las caspasas contienen tres dominios: un predominio N-terminal, una subunidad grande (p20) que contiene el centro activo con cisteína dentro de un motivo conservado QACXG, y una subunidad pequeña (p10) en el C-terminal. Son unas de las proteasas más específicas con un requerimiento inusual y absoluto de cortar después de un residuo de ácido aspártico (Asp). Tanto el predominio respecto de la subunidad grande como la subunidad grande respecto de la pequeña están separadas por una secuencia de Asp. Esto es consistente con la habilidad de las caspasas de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como



parte de una cascada de amplificación. Las caspasas efectoras se encuentran formando dímeros inactivos en el citosol y pasan a activas mediante la escisión en su lugar de corte entre la subunidades grande y pequeña (Boatright et al., 2003). A diferencia de las caspasas efectoras, las iniciadoras no se activan por tal rotura, sino que son activadas por interacciones reguladas proteína-proteína (Green, 2003).

Existen tres mecanismos generales de activación de caspasas:

1. **Activación por otra caspasa:** en base a su estructura se puede suponer que una posibilidad de activación sea la autocatálisis, es decir, la activación de una procaspasa exponiéndola a otra previamente activada. Esta estrategia de activación denominada cascada de caspasas es muy utilizada por las células para la activación de las caspasas efectoras de predominio corto. La cascada de caspasas es un método útil para amplificar e integrar las señales proapoptóticas, pero no puede explicar cómo se activó la primera caspasa. Existen al menos dos aproximaciones que explican dicha activación (Yuan y Horvitz, 2004).
2. **Activación inducida por proximidad:** la caspasa-8 es la caspasa iniciadora clave en la vía de los receptores de muerte celular (ver página 52). Después de la unión del ligando, los receptores de muerte como Fas se agregan y forman un complejo de señalización de membrana. Estos complejos reclutan, a través de sus proteínas adaptadoras, varias moléculas de procaspasa-8 con lo que se aumenta la concentración local de proenzima. En estas condiciones, la actividad proteasa intrínseca de la procaspasa-8, aunque baja, es suficiente para permitir que varias moléculas inactivas se corten mutuamente y se activen unas a otras (Shi, 2004).
3. **Asociación con una subunidad reguladora:** el mecanismo de activación más complejo es el utilizado por la caspasa-9. Al contrario que en otras caspasas, el procesamiento proteolítico de la procaspasa-9 tiene un efecto mínimo en su activación. El requerimiento clave para la activación de la caspasa-9 es su asociación con un cofactor de proteínas, Apaf-1. También es necesario el citocromo c liberado por la mitocondria. El citocromo c y Apaf-1 se asocian en un proceso dependiente de ATP. La oligomerización de Apaf-1 recluta procaspasas-9 formando el

apoptosoma. La activación de la caspasa-9 es debida a un cambio conformacional, y no exclusivamente a la proteólisis (Chen y Wang, 2002; Nicholson y Thornberry, 2003).

Durante la apoptosis, las caspasas efectoras activan numerosas proteínas localizadas tanto en la membrana celular, como en el núcleo y citoplasma. La activación de endonucleasas facilita la degradación del DNA (Nagase et al., 2003), la rotura de laminas nucleares ayuda a la contracción nuclear (Gruenbaum et al., 2003) junto a todo ello, la activación de la cinasa 2 activada por p-21 son algunas de las muchas funciones mediadas por caspasas en el procesos apoptótico (Rudel and Bokoch, 1997).

Se han caracterizado dos vías principales de activación de la apoptosis, una vía extrínseca y otra intrínseca o mitocondrial (Green, 2003; Johnstone et al., 2002; Wang, 2001).

### *Vía extrínseca*

La vía extrínseca o de los "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular. Se han identificado dos familias de receptores con estas características: la proteína Fas y el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF). Estos receptores reciben las señales proapoptóticas desde el exterior y participan en la activación de caspasas iniciadoras, las cuales a su vez, rompen y activan a caspasas efectoras (Bhatia, 2004).

### *Vía intrínseca*

La otra vía de inducción de apoptosis es la vía intrínseca o mitocondrial. Se llama así porque necesita de la desorganización de la membrana mitocondrial y liberación de proteínas mitocondriales como el citocromo c (Nicholson y Thornberry, 2003). La regulación de esta vía corre a cargo de las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2. La proteína Bcl-2 es el prototipo de esta gran familia de proteínas pro- y antiapoptóticas. Se distribuyen funcionalmente en tres subfamilias (Huang y Strasser, 2000; Joza et al., 2002):

- Subfamilia Bcl-2 (anti-apoptótica): *Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1, BCL2A1, BCL-B*.
- Subfamilia Bax (pro-apoptótica): *Bax, Bak, Bok*.
- Subfamilia BH3 (pro-apoptótica): *Bad, Bid, Bik, Blk, BimL, PUMA, NOXA, BMF, HRK*.

Los miembros antiapoptóticos de esta familia, incluida la propia Bcl-2, se caracterizan por presentar 4 dominios de homología Bcl-2 (BH), desde BH1 hasta 4. Sin embargo, los miembros proapoptóticos tienen o bien 3 dominios BH (BH1, BH2, y BH3), como por ejemplo Bax y Bak, o bien un único dominio BH3, como por ejemplo, Bim, Bid, y Bad (Youle and Strasser, 2008).

Los dominios BH1, BH2, y BH3 de las proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-XL forman entre ellos una hendidura hidrofóbica que se puede unir al dominio anfipático BH3  $\alpha$ -helicoidal de proteínas proapoptóticas. De este modo, los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 antagonizan la apoptosis a nivel de la mitocondrias mediante la unión y la neutralización de los proapoptóticos Bax y Bak (Chipuk et al., 2010).

El mecanismo exacto por el que los miembros de la familia Bcl-2 modulan la apoptosis no está aún claro. La principal función de las proteínas proapoptóticas de esta familia parece ser la formación de un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana, entre ellas el citocromo c (Suzuki et al., 2000a).

La mitocondria se ha considerado clásicamente como la principal fuente de energía de la célula aunque actualmente también se le considera como un guardián que determina el destino de la célula. La decisión mitocondrial sobre si la célula vive o muere es una determinación compleja donde intervienen varios factores como ERO, interacciones proteína-proteína, modificaciones iónicas, y otros mecanismos aun por elucidar. Una vez que comienza el proceso de muerte celular, la mitocondria experimenta una serie de cambios conformacionales que desembocan en la liberación del citocromo c, caspasas, endonucleasas y otros factores que dirigen el inicio y ejecución de la apoptosis (Kroemer, 2003). La liberación del citocromo c es casi una característica universal en respuesta a varios estímulos intracelulares, como daños en el ADN, glucocorticoides y estrés oxidativo, entre otros (Adrain and Martin, 2001). Los mecanismos por los que la mitocondria libera el citocromo c no están aun claros, y dependen del tipo de célula, del ambiente celular y del desencadenante apoptótico (Polster et al., 2001).

El citocromo c se encuentra en el espacio intermembrana, unido a la membrana mitocondrial interna mediante la asociación con el fosfolípido aniónico cardiolipina. La cardiolipina se encuentra únicamente en la mitocondria y predominantemente en la membrana mitocondrial interna. Existen evidencias que proponen esta disociación entre

el citocromo c y la cardiolipina como un punto crucial en la liberación de éste al citosol y el comienzo de la apoptosis. Esta disociación se facilita a través de la peroxidación de la cardiolipina, lo que resulta en una disminución de la afinidad de unión para la hemoproteína. Además, la unión del calcio a la cardiolipina provoca una disminución en la movilidad lipídica y promueve la formación de dominios enriquecidos en cardiolipina y proteínas en la membrana mitocondrial interna. Este reordenamiento, a su vez, conduce a un aumento de la producción de ERO por la cadena respiratoria, que promueve la oxidación de los fosfolípidos de membrana y proteínas y, como resultado, un aumento de la permeabilidad de la membrana (Orrenius et al., 2003). Esta permeabilización de la membrana mitocondrial, que implica la liberación de proteínas mitocondriales proapoptóticas como el citocromo c, está regulada por las acciones pro- y antiapoptóticas de los miembros de la familia Bcl-2.

Además de esta función mitocondrial, los miembros antiapoptóticos también actúan en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> a nivel del ER (Lam et al., 1994).

Estudios recientes, han puesto de manifiesto el papel de la CCK en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis en la célula acinar (Gukovskaya et al., 2002a). Los resultados muestran que la hiperestimulación con CCK dispara las vías de señalización de muerte en las células pancreáticas de rata acinares, incluyendo activación de caspasas, liberación del citocromo c, y despolarización mitocondrial, conduciendo a la apoptosis.

El efecto neto es la liberación regulada de factores proapoptóticos desde la mitocondria y la pérdida potencial de la función mitocondrial.

Aunque las señales extrínsecas e intrínsecas se consideran como dos vías ejecutoras de muerte celular diferentes, la vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial, liberación del citocromo c y la posterior activación de la caspasa-9 (Green, 2003).

El desenlace de una célula que recibe un estímulo apoptótico depende de la proporción de promotores y supresores de muerte celular presentes en la célula (Adams y Cory, 2001).

## ***Necrosis***

Los factores que contribuyen al proceso de necrosis son principalmente extrínsecos, como toxicidad, traumatismo o daño osmótico (Majno y Joris, 1995).

Se caracteriza por una pérdida progresiva de integridad en la membrana plasmática, una entrada rápido de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y agua, resultando en una hinchazón o “*swelling*” del citoplasma y picnosis nuclear (BarERO et al., 2001a; Berridge et al., 2000). También tiene lugar una gran vacualización citoplasmática y un proceso de autofagia mitocondrial (Cory y Adams, 2002). Posteriormente se produce la fragmentación celular y liberación del contenido intracelular, iniciándose con esto el proceso inflamatorio (Padanilam, 2003; Scaffidi et al., 2002).

Se trata de un proceso “pasivo” que ocurre como consecuencia de un agotamiento agudo de ATP. Los diferentes canales iónicos dependientes de ATP se vuelven inefectivos, produciéndose alteración de la homeostasis iónica, desorganización del citoesqueleto de actina, swelling celular y colapso eventual de la célula (Maeno et al., 2000).

Artículos recientes sugieren que además de un mecanismo pasivo podrían intervenir varios mecanismos “activos”, tales como una sobrecarga de  $\text{Na}^+$ , acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  y cambios en la permeabilidad mitocondrial, en el proceso necrótico (BarERO et al., 2001b; Lemasters, 1999). Al aumentar los niveles de  $\text{Na}^+$  en el citosol aumenta la actividad de ATPasas- $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ , y se consume más ATP, lo que a su vez activa canales no específicos de calcio resultando en la acumulación masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Los altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden contribuir al agotamiento de ATP por activación de ATPasas- $\text{Ca}^{2+}$  y despolarización de la mitocondria. Estos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  también pueden activar endonucleasas que degradan el ADN y activan proteasas celulares como la calpaina, responsable de la degradación de varias proteínas estructurales y de señalización (Wang, 2000).

El fallo en la producción de ATP reduce la capacidad de la célula acinar para expulsar el  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma. En estas circunstancias, las mitocondrias perigranulares no pueden amortiguar el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la zona apical. Esta aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  incrementa la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria, e induce un mayor colapso de potencial de membrana y la discapacidad de la producción de ATP, hasta que la célula pasa más allá de cualquier capacidad suficiente para sostener la producción de ATP para la apoptosis, de manera que resulta en muerte por necrosis (Criddle et al., 2007).

El mecanismo más importante de la inhibición de ATPasas- $\text{Ca}^{2+}$  por toxinas que inducen pancreatitis es probablemente esta discapacidad de la mitocondria para producir ATP (Criddle et al., 2006).

A través de mecanismos comunes, las señales de muerte celular pueden causar tanto apoptosis como necrosis, dependiendo de ciertas variables como el suministro de ATP.

### ***Relación apoptosis-necrosis en la pancreatitis aguda.***

La pancreatitis aguda, tanto clínica como experimentalmente se caracteriza por una muerte celular progresiva. Clásicamente se ha considerado la necrosis como la principal forma de muerte celular en la pancreatitis aguda (Kloppel y Maillet, 1993), mientras que la apoptosis se propuso intercesora en la atrofia del órgano (Walker, 1987). Sin embargo, escrupulosos estudios bioquímicos y diversos exámenes morfológicos han puesto de manifiesto en modelos experimentales que una pancreatitis aguda grave se asocia principalmente con necrosis y poca apoptosis, mientras que una pancreatitis aguda leve se asocia con una muerte celular por apoptosis y poca necrosis (Hahm et al., 1998).

Sandoval y colaboradores (1996), indicaron que la ceruleina estimula la producción pancreática del factor de activación plaquetario (PAF). Éste media tanto la apoptosis como la quimiotaxis de neutrófilos en el páncreas. Los neutrófilos a su vez transforman células apoptóticas en necróticas. La infiltración de neutrófilos es bastante significativa a este respecto, ya que se ha visto que la reducción en su número o la eliminación genética de la NADPH oxidasa disminuye significativamente la gravedad de la pancreatitis aguda experimental (Gukovskaya et al., 2002b).

El aumento de apoptosis se muestra inversamente relacionado con la gravedad de la enfermedad, por lo que datos recientes proponen la promoción de la apoptosis, mediante el bloqueo de inhibidores endógenos de caspasas, como protección frente a la necrosis del órgano (Mareninova et al., 2006), ya que el fomento de la apoptosis puede reducir la capacidad de las células acinares de producir tal respuesta inflamatoria.

La CCK produce alteraciones mitocondriales, y esta disfunción mitocondrial esta mediada por las caspasas. Además de apoptosis, las caspasas también participan en otros procesos en la célula acinar que juegan un papel muy importante en la pancreatitis, destacando la regulación negativa de la necrosis y de la activación intracelular de tripsina (Gukovskaya et

al., 2002a). La protección mediada por caspasas frente a la necrosis y activación de tripsina puede explicar la correlación inversa entre la relación apoptosis/necrosis y la gravedad de la enfermedad observada en los modelos experimentales de pancreatitis. De hecho, estos mecanismos de señalización pueden tener un papel importante en el daño y muerte de la célula acinar en la pancreatitis.

## **Dieta Mediterránea**

La implicación de la dieta en la salud y en la prevención y tratamiento de enfermedades, es algo que se conoce muy bien, además de estar reconocido y aceptado por instituciones y organismos internacionales desde hace mucho tiempo (Nestle, 1995).

La salud individual, y de la población en general, es el resultado de la interacción entre genética y factores ambientales. Dentro de estos factores ambientales la nutrición es sin duda el de mayor importancia (Simopoulos y Childs, 1990; Simopoulos y Nestel, 1997). Gracias a los estudios epidemiológicos realizados en las últimas décadas, el papel de la dieta en la prevención y control tanto de la morbilidad como de la mortalidad prematura debida a enfermedades no transmisibles tipo cáncer o enfermedades cardiovasculares, es bastante conocido por la mayoría de la población (Keys et al., 1986; Lichtenstein et al., 2006).

Un gran número de estudios epidemiológicos han mostrado que las poblaciones que viven alrededor del Mediterráneo tienen una baja incidencia de enfermedades crónicas con etiología oxidativo-inflamatoria, como por ejemplo enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer entre otras, en comparación con poblaciones del norte de Europa (Keys, 1980; Trichopoulou et al., 1995a; Trichopoulou et al., 1995b). Así, la dieta mediterránea determina un reducción del 9% en la mortalidad de enfermedades cardiovasculares, del 6% en la incidencia o mortalidad de neoplasias, y una reducción del 13% en la incidencia de enfermedades como Parkinson y Alzheimer (Sofi et al., 2008). Aunque pueda haber cierta variabilidad regional, una característica común y distintiva en los países Mediterráneos es el alto consumo de aceite de oliva como principal grasa culinaria (Trichopoulou et al., 2000).

La tradicional “dieta mediterránea” hace referencia al consumo de determinados alimentos muy específicos, que constituyeron en los años 60 un patrón alimenticio típico de algunas

regiones mediterráneas como Creta, España y el sur de Italia. En general, aunque existen diferencias entre unas zonas y otras, esta dieta se caracteriza por un consumo elevado de frutas, vegetales, cereales, pastas, aves de corral, legumbres, frutos secos, pescados y productos lácteos, además de pequeñas cantidades de carnes rojas y un consumo moderado de vino tinto, casi siempre con las comidas. Aunque la ingesta de leche es moderada, el consumo de queso y yogurt es bastante alto. Esta dieta es baja en grasas saturadas (< 7-8% de la energía diaria) con una ingesta total de grasas que va desde el 35 al 40 % de los requerimientos energéticos diarios. La relación de ácidos grasos monoinsaturados y saturados es mayor de dos, siendo el aceite de oliva la principal fuente de ácidos grasos monoinsaturados y el principal componente de la dieta mediterránea. El aceite de oliva virgen conserva todos los componentes lipofílicos de la fruta,  $\alpha$ -tocoferol, y componentes fenólicos con fuertes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Además, los frutos secos, también típicos en este tipo de dieta, son una fuente rica de nutrientes y otros componentes bioactivos los cuales influyen beneficiosamente en la prevención de enfermedades coronarias, así como fibra, fitoesteroles, ácido fólico y antioxidantes. La ingesta de frutos secos se ha asociado con una disminución en la tasa de enfermedades coronarias. Las nueces, a diferencia de otros frutos secos tienen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, particularmente  $\alpha$ -linoleico, convirtiéndola en una planta n-3 que puede conferir propiedades antiaterogénicas y rica fuente de antioxidantes fotoquímicos (Kouris-Blazos et al., 1999; Tyrovolas and Panagiotakos, 2010). Sin embargo, se ha visto que la suplementación con estos frutos secos no ha resultado igual de efectiva para aumentar la capacidad antioxidante que el aceite de oliva virgen (Razquin et al., 2009).

Al tratarse de una dieta rica en grasas, 40%, la hace de particular interés gastronómico ya que esto le proporciona una mayor palatabilidad que contribuye a un alto grado de aceptación popular. Sin embargo, a diferencia de otras dietas ricas en grasas, como la dieta occidental, el mayor porcentaje del contenido graso de la dieta mediterránea es proporcionado por el aceite de oliva, convirtiéndola en una dieta baja en grasas saturadas y colesterol, carente en ácidos grasos *trans* y rica en ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), especialmente ácido oleico (C18:1, n-9). Los últimos estudios demuestran que el aceite de oliva es algo más que una grasa monoinsaturada. Se trata de un zumo extraído únicamente mediante tratamientos físicos, por lo que conserva una importante cantidad de componentes minoritarios presentes en el fruto de la oliva y de gran interés.



Parece demostrado que la dieta Mediterránea tiene efectos beneficiosos para la salud, y estos son en parte consecuencia del alto contenido en MUFAs (que constituyen un 85% del aceite de oliva), en compuestos fenólicos antioxidantes (como el hidroxitirosol) y en ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFAs n-3). La dieta Mediterránea de tipo cretense no solo contiene cantidades elevadas de ácido  $\alpha$ -linolénico sino que al contener pocos PUFAs  $\omega$ -6 favorece que se produzca una mayor transformación del linolénico en sus metabolitos de cadena más larga, ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5  $\omega$ -3) y docosahexaenoico (DHA, C20:6 n-3), que son precursores de una serie de prostanoides menos proinflamatorios que los obtenidos a partir de la serie n-6 (Wahle et al., 2004). Por otro lado, estudios de intervención como el Lyon Heart Study (Renaud et al., 1995) han revelado que los altos niveles de ácido oleico en plasma consecuencia de la ingesta de aceite de oliva se asocian con un aumento en la relación ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3 n-3)/ácido linoleico (C18:2 n-6) y se favorece la elongación de los PUFAs n-3 hasta EPA y DHA, lo que a nivel cardiovascular tiene repercusiones similares a las de la administración de aceite de pescado, rico en estos ácidos grasos. Este efecto de la transformación del linolénico en DHA como consecuencia de altas ingesta de oleico ha sido también descrito por otros autores (Wahle et al., 1991). Por último, tenemos los compuestos fenólicos tipo hidroxitirosol (HT) que, aunque están en cantidades muy pequeñas, han mostrado ser capaces de atenuar procesos oxidativos e inflamatorios cuando se administran en concentraciones nutricionalmente relevantes (Carluccio et al., 2003).

Sin descartar otras posibilidades, el mecanismo principal del efecto antiinflamatorio del aceite de oliva y la grasa de pescado se debe a la incorporación de los ácidos grasos dietéticos en las membranas biológicas y a las propiedades que esto confiere a la célula. Los ácidos grasos incorporados a los fosfolípidos de las membranas celulares pueden modificar el funcionamiento celular:

- i) Por un lado, los fosfolípidos de membrana son responsables de la fluidez de la misma, lo que afectará a los diferentes componentes anclados en ella y a la interacción entre estos componentes con el medio externo (ej. receptor-agonista) o con el interior celular (ej. acción de fosfolipasas).
- ii) Por otro lado, diversas señales intracelulares parten de estos fosfolípidos (ej. IP3- $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, productos de peroxidación lipídica altamente citotóxicos) y, por

tanto, su composición en ácidos grasos afectará diferentes vías de transducción de señales.

- iii) Por último, los ácidos grasos de los fosfolípidos son sustratos para la síntesis de eicosanoides, mediadores fundamentales en los procesos inflamatorios.

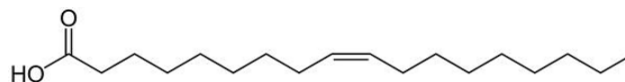
De hecho, nuestros propios trabajos han puesto de manifiesto que la modificación de la composición en ácidos grasos de membrana inducida por la dieta (Diaz et al., 2003; Martinez et al., 2002; Mataix et al., 1998) (Martinez et al., 2003) se acompaña de marcadas diferencias en la susceptibilidad frente a un ataque oxidativo (Battino et al., 2002; Mataix et al., 1998; Quiles et al., 1999a; Quiles et al., 1999b, 2001; Yago et al., 2005) y de cambios funcionales a nivel de vías de transducción de señal (Martinez et al., 2004; Yago et al., 2006; Yago et al., 2004).

A la vista de la información disponible, estos tres componentes funcionales que encontramos en la dieta Mediterránea, MUFAs, PUFAS $\omega$ -3 y HT, tienen un papel muy significativo en la prevención de enfermedades crónicas propias de las sociedades occidentales. Su actuación en la atenuación de procesos oxidativos e inflamatorios parece realizarse mediante la inhibición de la expresión de citocinas, reducción de su actividad, modificación de señales intracelulares, etc. (Heidemann et al., 2008).

### ***Ácido Grasos Monoinsaturados***

Como se ha comentado anteriormente, el aceite de oliva es el principal componente de la dieta mediterránea. La mayoría de los efectos beneficiosos de este aceite se han atribuido principalmente a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), mayoritariamente ácido oleico (C18:1 n-9) y a las propiedades antioxidantes de sus componentes fenólicos, como el HT (Kok y Kromhout, 2004; Tripoli et al., 2005).

En comparación con los ácidos grasos poliinsaturados, el ácido oleico (figura 6), al ser monoinsaturado tiene un único enlace doble, lo que le proporciona una mayor estabilidad y una menor susceptibilidad a la oxidación, contribuyendo con esto a la acción antioxidante (Owen et al., 2000).



**Figura 6.** Estructura del ácido oleico (18:1 n-9)

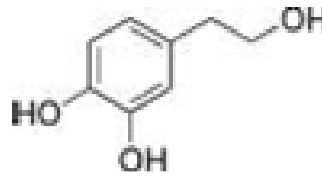
Son varios los efectos saludables relacionados con una dieta rica en MUFAs, uno de ellos es la disminución en la activación endotelial y en la tendencia de la LDL a oxidarse. De hecho, se han llevado a cabo estudios con lipoproteínas enriquecidas con ácido oleico, que revelan una menor susceptibilidad a la oxidación que las enriquecidas con ácido linoleico y araquidónico, presentando además una menor actividad proinflamatoria en condiciones de oxidación (Lee et al., 1998). También se han relacionado con el metabolismo de la insulina, al verse como en pacientes diabéticos tratados con una dieta rica en MUFAs, disminuye el requerimiento a la insulina en comparación con otras dietas ricas en carbohidratos (Garg et al., 1988). Otra característica es que las membranas enriquecidas en MUFAs presentan una mayor resistencia a procesos oxidativos, sirviendo de protección frente el envejecimiento celular (Quiles et al., 2006). Soriguer y colaboradores (2003) encontraron una relación inversa entre el consumo de MUFAs y la presión arterial en la población, relacionándose con la disminución en el riesgo a padecer hipertensión.

### ***Hidroxitirosol***

Con respecto a los compuestos fenólicos presentes en la dieta Mediterránea, entre los que se incluye el HT (figura 7) presente en la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen, la evidencia científica parece indicar que sus efectos beneficiosos en desórdenes oxidativo-inflamatorios (Wahle et al., 2004) se deben a su potente actividad antioxidante (Visioli and Galli, 2002), lo cual es fácilmente comprensible si tenemos en cuenta que la actividad de algunos factores de transcripción implicados en la expresión de genes pro-inflamatorios, como el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), depende del estado redox de la célula (Pahl, 1999). En general, esta potente capacidad antioxidante del HT se relaciona con la acción antiinflamatoria, el carácter quimioprotector y la prevención en la formación de placas ateroscleróticas, entre otros.

Puede regular el metabolismo de los lípidos, gracias al hecho de ser absorbidos en el intestino. Además de presentar propiedades antiaterogénicas, en concreto la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno y proteger del daño oxidativo a la LDL (Moreno et al., 2001; Visioli and Galli, 1994), también muestra un efecto protector en modelos de inflamación in vivo (Carluccio et al., 2003; Martínez-Dominguez et al., 2001).

En cultivos celulares se ha podido observar como la presencia de HT reduce los niveles de RNA mensajero de moléculas de adhesión celular como la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), interfiriendo en la activación del principal factor de transcripción que controla la activación endotelial, el NF- $\kappa$ B (Carluccio et al., 2003).



**Figura 7.** Estructura del hidroxitiroso (2-(3,4-Dihidroxifenil) etanol)

Con todo, se ha visto que la suplementación de la dieta con HT mejora el sistema de defensa antioxidante y disminuye la peroxidación lipídica (Nakbi et al., 2010).

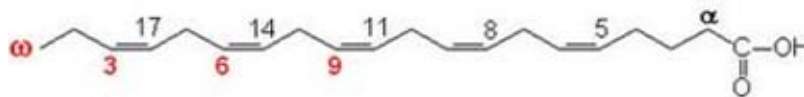
### ***Ácidos Grasos Poliinsaturados Omega-3***

Es de especial interés el tipo de grasa poliinsaturada presente en la dieta. Actualmente, son muchos los estudios que han puesto de manifiesto los beneficios de los  $\omega$ -3 en la disminución de enfermedades cardíacas, pero además, se ha visto una relación entre una elevada ingesta de estos ácidos grasos y una reducción en el riesgo de muerte súbita, probablemente relacionada con una disminución en el daño cardíaco (Albert et al., 2002; Hu y Willett, 2002).

La proporción presente en la dieta de los diferentes ácidos grasos n-3 y n-6, puede alterar la composición de ácidos grasos de la membrana celular e influir en la respuesta inmune

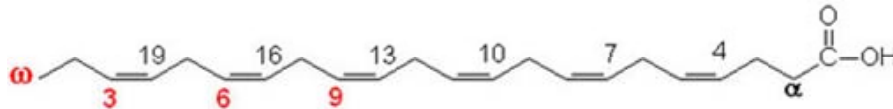
mediante la síntesis de determinados eicosanoides (Lipsky, 2000; Simopoulos, 2009). Dada la característica antiinflamatoria de los PUFAs n-3 y que la pancreatitis aguda está asociada con una respuesta inflamatoria hoy en día son varios los estudios que los aconsejan en el tratamiento no solo de enfermedades como la artritis reumatoide y la colitis ulcerosa, sino también en la pancreatitis aguda (Kilian et al.).

El EPA (figura 8), principal componente del aceite de pescado, se incorpora rápidamente a los fosfolípidos de las membranas celulares, reemplazando al ácido araquidónico como sustrato y se convierte en prostaglandinas E<sub>3</sub> (PGE<sub>3</sub>) y leucotrienos B<sub>5</sub> (LTB<sub>5</sub>), prostanoides biológicamente menos activos (Kilian et al.).



**Figura 8.** Estructura del ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 $\omega$ -3)

Por otra parte, se ha visto que el DHA (figura 9) reduce la adhesión y migración de los monocitos e influye en la interacción entre leucocitos y células endoteliales. De Caterina demostró que el consumo de DHA reduce la expresión de moléculas como VCAM 1, E-selectina, molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM 1), IL-6 e IL-4 en respuesta a las interleucinas IL-1, IL-4 o el TNF $\alpha$  (De Caterina and Zampolli, 2007). Estos mecanismos se consideran determinantes en la mejora de la microcirculación, que es uno de los principales factores en el desarrollo de la necrosis en la pancreatitis aguda.



**Figura 9.** Estructura del ácido docosahexaenoico (DHA, 20:6 $\omega$ -3)

Una dieta rica en PUFAs  $\omega$ -3 puede resultar beneficiosa en el tratamiento de la pancreatitis aguda, como se ha visto en rata, ya que además de regular la liberación y proliferación de citocinas juegan un papel importante en la respuesta inmune (Kilian et al., 2006).

### ***Ácidos grasos e inflamación***

Cuando nuestras células reciben estímulos específicos se activan enzimas que hidrolizan los fosfolípidos de las membranas. Una de estas enzimas es la fosfolipasa A2 (PLA2) de la cual existen varias isoformas. Una de ellas en concreto, la fosfolipasa A<sub>2c</sub> dependiente de calcio citosólico (cPLA<sub>2c</sub>), tiene un papel esencial en la liberación del ácido araquidónico (AA) (Alonso et al., 1986; Murakami and Kudo, 2004). La activación de esta enzima depende del aumento de calcio citosólico y de una serie de acontecimientos de fosforilación. Esta actividad se ve aumentada en especial por la fosforilación dependiente de MAPK. Una vez activada, se trasloca a las membranas celulares donde rompe específicamente el enlace éster en posición sn-2 de los fosfolípidos y produce sobre todo AA (Hefner et al., 2000).

Este ácido araquidónico (AA) se convierte (en el retículo endoplasmático liso y membrana nuclear) en compuestos eicosanoides mediante reacciones de oxidación (peroxidación lipídica). En estas reacciones participan las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) que originan prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina (prostanoides de la serie 2) y las lipoxigenasas (5-, 8-, 12-, 15-, lipoxigenasa, n-LOX-1) que originan leucotrienos, lipoxinas y ácidos hidroxieicosatetraenoicos (8-, 12- y 15-HETE, prostanoides de la serie 4). Otro ácido graso poliinsaturado n-6, el ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico es susceptible de actuar como sustrato de las ciclooxigenasas y la 15-lipooxigenasa, dando lugar a los prostanoides de la serie 1 y ácidos 15-HETE, respectivamente. Las ciclooxigenasas catalizan la bis-dioxigenación del AA hasta endoperóxidos (PGH<sub>2</sub>) (se produce la ciclación del ácido araquidónico entre los átomos de carbono 8 y 12), mientras que las lipoxigenasas catalizan la mono-dioxigenación del mismo ácido graso hasta hidroperóxido alílico (HPETE). Las enzimas que intervienen

en la formación de las prostaglandinas son la PGH-PGD isomerasa (PGD2), PGH-PGE isomerasa (PGE2) y PGH2 reductasa (PGF2); en la formación de los tromboxanos es la TXA sintasa (TXA2); en la formación de la prostaciclina es la PGI2 sintasa (PGI2); y en los leucotrienos son la LTB4 sintasa/LTB5 hidrolasa (LTB4) y la LTC4 sintasa (LTC4).

La mayoría de los prostanoides de la serie 2 tienen una existencia efímera, de minutos incluso de segundos. Pero son efectores poderosos, con actividades biológicas muy variadas incluso contrapuestas. Las prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina se relacionan con funciones secretoras, digestivas y reproductoras, entre otras; mientras que los leucotrienos y lipoxinas intervienen en respuesta alérgica, inflamatoria e inmune, y en la quimiotaxis. La regulación de estos compuestos eicosanoides depende de los precursores y competidores que se incorporan en nuestra dieta. Así, los ácidos grasos EPA y DHA (C20:5 n-3 y C22:6 n-3) desplazan al AA de los compartimentos intracelulares de ácidos grasos, reduciendo su metabolismo y disponibilidad para las ciclooxigenasas y lipoxigenasas. Además, el metabolismo de la familia n-3 puede afectar los mecanismos de transducción intracelular y la expresión de genes asociados al metabolismo de los ácidos grasos de la familia n-6, así el EPA puede competir con el AA por las ciclooxigenasas y lipoxigenasas dando lugar a los prostanoides de las series 3 (PGE3, PGF3, TXA3, TXB3, PGI3) y 5 (LTB5, LTC5, LTD5, LTE5), menos activos que los de las series 2 y 4. Por estos motivos es muy importante el balance entre la ingesta de ácidos grasos n-3 y n-6.

El consumo de ácidos grasos de la serie n-6 (omega-6) en las poblaciones occidentales es del orden de 20 a 25 veces mayor que el consumo de los de la serie n-3 (conocidos como omega-3). Esto se debe principalmente a la abundancia en la dieta occidental de ácido linoleico (C18:2 n-6), presente en cantidades elevadas en algunos aceites como girasol y maíz. Tan solo en las poblaciones mediterráneas, el consumo de ácido oleico, debido al aceite de oliva, y de ácidos grasos n-3, debido a la ingesta relativamente elevada de pescado, es muy superior al resto de los países occidentales (Mataix and Gil, 2002).

El linoleico y el  $\alpha$ -linolénico (C18: n-3) son metabolizados hasta AA y EPA en el intestino, hígado y cerebro del ser humano, pero dada la abundancia relativa en la dieta de linoleico el compuesto mayoritario incorporado a los fosfolípidos de las membranas celulares es el AA.

El EPA puede inhibir el metabolismo del AA de forma competitiva y suprimir o limitar la producción de eicosanoides proinflamatorios. El EPA es un sustrato potencial para la síntesis de TXA3, vía ciclooxigenasa, sin embargo esta enzima es muy poco eficiente

cuando utiliza el EPA como sustrato. Por otra parte, a partir de EPA la lipoxigenasa puede contribuir a la formación de LTB<sub>5</sub>, un compuesto con escasa actividad proinflamatoria. Así, una dieta rica en n-3 puede desviar el equilibrio de los eicosanoides hacia la formación de compuestos con menor actividad inflamatoria. Por otra parte, el uso de dietas ricas en ácido oleico (C18:1 n-9) puede inhibir la formación de LTB<sub>4</sub>, ya que pequeñas cantidades de ácido eicosatrienoico de la serie n-9, formadas a partir del ácido oleico, inhiben la leucotrieno A<sub>4</sub>-hidrolasa.

La inclusión de dietas ricas en ácidos grasos n-3 puede suprimir la producción de TNF- $\alpha$  y de IL-1. Tanto el aceite de pescado, rico en n-3 como el DHA y EPA, se ha visto que disminuye la síntesis de TNF- $\alpha$ , IL-1, o ambas, tanto en sujetos sanos como en pacientes con artritis reumatoide (Kremer, 2000). Asimismo, la ingesta de una dieta rica en aceite de oliva en pacientes con artritis reumatoide disminuye la producción de IL-1 por los monocitos en un 38%. Por otra parte, la producción de IL-2 y de su receptor por linfocitos, tanto en modelos experimentales como en sujetos humanos sanos, disminuye cuando son alimentados con dietas enriquecidas en aceite de oliva. De igual modo, en el caso de la producción de IL-6 por fibroblastos humanos, en cultivo, es menor en presencia de ácido oleico. El consumo de aceite de oliva virgen, en hombres adultos sanos por un periodo de 2 meses, da lugar a un aumento en la formación de la molécula de adhesión MCA-1 por los leucocitos, lo cual sugiere implicaciones relevantes del consumo de ácido oleico en la prevención de la aterosclerosis y de otras enfermedades inflamatorias (De Pablo et al., 2000). También se ha demostrado que los ácidos grasos n-3 pueden inhibir la producción de IL-1 $\beta$  y de TNF- $\alpha$  (Mataix and Gil, 2002).

Dada la característica antiinflamatoria de los PUFAs n-3 y que la pancreatitis aguda está asociada con una respuesta inflamatoria hoy en día son varios los estudios que los aconsejan en el tratamiento no solo de enfermedades como la artritis reumatoide y la colitis ulcerosa, sino también en pancreatitis aguda (Kilian et al.).

## **Efecto de los ácidos grasos de la dieta sobre el Perfil Lipídico de la membrana celular.**

La membrana plasmática es una estructura delgada, flexible y elástica que reviste a la célula. Está formada casi por completo por proteínas y lípidos. La composición aproximada es un 55% de proteínas, un 25% de fosfolípidos, un 13% de colesterol, un 4% de otros lípidos y



un 3% de hidratos de carbono (Guyton y Hall, 2001). Su estructura básica es una bicapa lipídica, consistente en una delgada lámina de lípidos de sólo dos moléculas de grosor, continua a lo largo de la superficie celular. En esta lámina lipídica se intercalan grandes moléculas de proteínas globulares.

Entre las principales funciones de la membrana plasmática la de ejercer de soporte y límite físico para la célula, participar en la transducción de señales desde el exterior al interior de la célula y ser el soporte de enzimas y proteínas, además de significar una barrera de intercomunicación con el medio extracelular y otras células (Stryer, 1995; Stryjek-Kaminska et al., 1994).

La composición de las membranas biológicas no es constante. Numerosos estudios han demostrado que determinados factores como la edad, el estado fisiológico, la capacidad antioxidante, la actividad metabólica o la dieta, pueden modular la estructura y la función de las membranas celulares (Clandinin et al., 1985).

La presencia de moléculas lipídicas en la bicapa influye en la estructura y en el funcionamiento de la célula, ya que condicionan las propiedades fisiológicas de la membrana. Así, cambios en la distribución heterogénea de estos lípidos de membrana, pueden ser responsables de los efectos sobre las proteínas. Una característica especial de la bicapa lipídica es la fluidez, es decir, el estado fisicoquímico entre sólido y líquido. De este modo, las proteínas u otras sustancias disueltas o que “flotan” en la bicapa lipídica, difunden a todas las áreas de la membrana celular. Esta fluidez ha de estar regulada para que los procesos que tengan lugar en ella se desarrollen de forma óptima. La fluidez depende de diversos factores, entre los que se encuentran (Parola, 1993), el grado de insaturación y longitud de las cadenas hidrocarbonadas y la presencia de colesterol.

La presencia de dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos provoca angulaciones en éstas que impiden una ordenación estrecha entre ellas, generándose huecos. Esta situación favorece el movimiento lateral. Cuanto mayor sea el número de dobles enlaces, es decir, cuanto mayor sea el grado de insaturación, mayor será la fluidez de la membrana. Además, cuanto mayor sea la longitud de la cadena hidrocarbonada, mayor será la rigidez que proporcione a la membrana.

Una de las características fundamentales de la membrana biológica es la distribución asimétrica que presentan todos los componentes de la membrana, es decir, la diferente ubicación que presentan estos componentes en las monocapas interna o externa de la

membrana, que se mantiene a pesar de los distintos tipos de movimientos que la puedan afectar debido a sus implicaciones funcionales y estructurales (Bishop y Bell, 1988). Esta asimetría se debe a la distinta distribución de una especie molecular completa entre ambas monocapas, de los distintos ácidos grasos, y de los sustitutos de las cabezas polares de los fosfolípidos.

El modelo de bicapa lipídica es considerado como la base universal de la estructura de la membrana celular.

La grasa dietética puede modificar la composición de los ácidos grasos de la membrana en diferentes tipos de células de mamífero. Este cambio puede ser de tal magnitud que llegue a afectar las funciones celulares, entre ellas, el transporte mediado por transportador, vías de transducción, unión a receptores, y procesos de exocitosis (Chapkin et al., 2002; Quiles et al., 2001). La mayoría de las respuestas funcionales están relacionadas directamente con cambios en la estructura lipídica que afectan a la fluidez de los lípidos en general o a un dominio lipídico específico. La conformación de algunos transportadores, receptores, y enzimas puede verse afectada por estos cambios en el microambiente lipídico que los rodea, provocando por tanto cambios en su actividad.

Son varios los autores que estudian la adaptación a la grasa dietética tanto en las células animales como humanas, obteniendo respuestas muy diferentes y específicas dependiendo del tipo de tejido (Berlin et al., 1998). Unos tejidos responden mejor que otros. El hígado, por ejemplo, es muy sensible a los cambios en la dieta (Quiles et al., 1999a). Por el contrario, otros tejidos como el cerebro (Abedin et al., 1999) o músculo esquelético (Quiles et al., 1999a) muestran menor capacidad adaptativa en sus membranas celulares a este tipo de cambios.

Esta adaptación supone una modificación en el perfil lipídico de las membranas que conlleva cambios en la fluidez y en la función celular, particularmente la capacidad de transporte y actividad metabólica de la membrana (Clandinin et al., 1991).

### ***Adaptabilidad del acino pancreático***

Desde los estudios de Pavlov, en 1900, muchos autores se han interesado en la adaptación del páncreas exocrino al tipo de alimento disponible en varias especies. El consenso general de estos estudios es que existe una relación positiva entre la cantidad de hidratos de

carbono, proteínas y lípidos presente en la dieta y el contenido de enzimas pancreáticas presente en el tejido necesarias para su digestión. Con respecto a los lípidos presentes, parece que influye tanto la cantidad como el tipo (Yago et al., 1997).

Los mecanismos de adaptación del páncreas al tipo de grasa dietética no están aún claros. Aunque se ha demostrado en otros tejidos que la composición de ácidos grasos de la dieta influye en el perfil lipídico de las membranas celulares y que esto provoca un cambio en la función celular, la información disponible sobre el páncreas con respecto a este tópico es muy escasa. Parece ser que la composición de la grasa dietética puede cambiar la respuesta del páncreas a los secretagogos circulantes mediante la modificación de la composición de ácidos grasos de las células acinares pancreáticas.

Así, Yago y colaboradores (2004) en un estudio llevado a cabo en células acinares pancreáticas viables, aisladas de rata, confirmaron que el páncreas es muy sensible a los cambios en la grasa dietética. Se vio que las membranas pancreáticas de ratas alimentadas con una dieta rica en aceite de oliva virgen presentaban unos niveles altos de C18:1 n-9 (ácido oleico) y de ácidos grasos monoinsaturados totales mientras que las de ratas alimentadas con una dieta rica en aceite de girasol tenían niveles elevados de ácidos grasos poliinsaturados, particularmente PUFAs n-6, y en concreto ácido linoleico y ácido araquidónico.

La función principal de las células acinares pancreáticas es sintetizar, almacenar y estar sometidas a la regulación de la secreción de enzimas digestivas. Se ha aceptado durante muchos años que esta función exocrina se encuentra influenciada por el tipo de grasa presente en la dieta. Esto se ha visto normalmente analizando el contenido enzimático del páncreas en animales alimentados con diferentes lípidos dietético (Ricketts y Brannon, 1994; Sabb et al., 1986).

La adaptación de la membrana a los lípidos dietéticos se ha asociado con cambios *in vitro* en la actividad secretora de células acinares pancreáticas, tanto en condiciones basales como después de estimularlas con CCK-8. Los niveles basales de liberación de amilasa en acinos de ratas alimentadas con aceite de girasol fueron significativamente más altos que en los de ratas alimentadas con aceite de oliva (Yago et al., 2004). A diferencia de las condiciones basales, la secreción de amilasa neta en respuesta a varias concentraciones de CCK-8 fue menor en acinos de ratas alimentadas con aceite de girasol. Esto se asocia con cambios en las  $[Ca^{2+}]_c$  basales y en la movilización de  $Ca^{2+}$  inducida por CCK-8. Estas diferencias en la

actividad secretora y movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Yago et al., 2004) se relacionan, por tanto, con cambios inducidos por la dieta en la composición de la membrana celular, ya que la mayoría de los procesos de secreción asociados a estímulo son dependientes de la membrana.

La existencia de receptores CCK y Ach en el páncreas exocrino y su unión a la fosfolipasa C está bien establecida. Santana y colaboradores (2009) sugieren que un enriquecimiento diferencial en ciertos ácidos grasos podría influir en la accesibilidad de los receptores CCK, la interacción con proteínas G, o la funcionalidad de enzimas como fosfolipasas o la proteína cinasa C, la cual interacciona con la membrana celular durante su activación.

Martínez y colaboradores (2004), confirmaron mediante microscopía invertida de fluorescencia asociada a un sistema de perfusión, los efectos del aceite de oliva sobre las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en células aisladas. Observaron un aumento significativo en la amplitud de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, así como una menor frecuencia de las mismas, tras la estimulación con CCK-8 en células acinares de ratas alimentadas con una dieta rica en aceite de oliva con respecto a un grupo alimentado con un pienso comercial estándar para esta especie.

Algunos autores sugieren que la modificación de la membrana podría suponer una alteración en los precursores del  $\text{IP}_3$ . De modo que, un aumento en la producción de  $\text{IP}_3$  en acinos de rata alimentadas con aceite de oliva podría explicar el aumento en la movilización de calcio en respuesta a CCK-8 y Ach, ya que el incremento inicial en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  se debe principalmente a la liberación de calcio desde almacenes intracelulares sensibles a  $\text{IP}_3$  (Santana et al., 2009).

### ***Adaptabilidad de la línea celular AR42J***

Los lípidos de la membrana plasmática no son solo un soporte inerte para las proteínas sino que tienen un papel activo en la función celular. Una inadecuada distribución o errores en su metabolismo pueden causarle serios problemas a las células y al organismo. De hecho, los cambios en su organización pueden tener profundos efectos en la función celular (Maxfield y Tabas, 2005). Es por esto por lo que muchas investigaciones en el campo de la nutrición van destinadas a intentar elucidar el efecto de los lípidos dietéticos en la composición y función celular, a través cambios en el perfil lipídico de la membrana plasmática.

A pesar de que esta línea celular se está usando ampliamente en los últimos años, no existe mucha información disponible sobre el perfil de ácidos grasos en las membranas de estas células ni su posible modificación en cultivo.

Audi y colaboradores (2007) tras la suplementación del medio de cultivo con C18:1 n-9 (AR42J-O) y C18:2 n-6 (AR42J-L) y posterior análisis de las membranas aisladas de estas células mediante cromatografía gas-liquida, vieron un enriquecimiento de la membrana en el ácido graso en particular que se le añadió al medio y que el patrón y la dirección de estos cambios eran paralelos a los hallados en ratas alimentadas con dietas enriquecidas en aceite de oliva y de girasol. También demostraron una modulación, por parte de esta modificación, de la actividad secretora y de la transducción de señales tras la estimulación con CCK-8.

Otros estudios realizados en células AR42J han puesto de manifiesto un papel modulador por parte de la composición de ácidos grasos de la membrana, en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, tras ser expuestas a ácidos biliares (López-Millán et al., 2009). También se ha observado una influencia de esta composición lipídica en la viabilidad y peroxidación lipídica de esta línea celular en un modelo de pancreatitis aguda inducido por ceruleína (Santana et al., 2010).

Esto es importante, ya que las alteraciones en la membrana celular, en respuesta a la grasa dietética pueden tener consecuencias en la salud y afectar a la calidad de vida.

# **M**ATERIALES Y MÉTODOS



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño Experimental

#### *Cultivo Celular*

La línea celular derivada de pancreatoma de rata AR42J, procedente de la Colección Europea de Células Animales en Cultivo (ref. ECACC nº 93100618), fue suministrada por el Banco de Células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las condiciones de cultivo de rutina fueron 37°C en atmósfera controlada (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) y en medio RPMI 1640 con glutamina 2 mM y 10% de suero bovino fetal (FCS) inactivado. Previo a su uso, las células se diferenciaron mediante la adición al medio de cultivo de Dexametasona (DX) 100 nM durante 72 h (Bozem et al., 2000). El almacenaje, mantenimiento y los distintos tratamientos crónicos (DX, ácidos grasos, HT y ceruleína) de las células AR42J se realizó en la Unidad de Cultivos de Tejidos y Banco Celular del Centro de Instrumentación Científica de la UGR, con el objeto de optimizar la producción celular y evitar al máximo el riesgo de contaminaciones bacterianas. Las células se trajeron a nuestro laboratorio para la realización de los experimentos en el mismo día y siempre que se tuvo que aplicar un tratamiento en agudo, como en el caso de la determinación del Factor Nuclear-kB (NF-kB) que se hizo a los 30 min desde la aplicación de la ceruleína.

Debido a que estas células crecen en semisuspensión, con poca adherencia, no fue necesario tripsinizar en ningún caso. En algunos casos las células se cultivaron y trataron en frascos Falcon, y en otros casos, se cultivaron y trataron directamente en pocillos.

#### *Grupos Experimentales*

- **Grupo No Modificado (NM):** Células AR42J sin ningún tipo de modificación, es decir, con su membrana original.
- **Grupo No Modificado tratado con Ceruleína (CeNM):** células AR42J no modificadas e incubadas con ceruleína a dosis  $1 \times 10^{-8}$  M durante las 24 h anteriores a la realización de las determinaciones.



- **Grupo No Modificado + HT (NMHT):** Células AR42J sin ningún tipo de modificación, es decir, con su membrana original, e incubadas durante dos horas con una concentración 50  $\mu\text{M}$  del compuesto fenólico HT.
- **Grupo No Modificado + HT tratado con Ceruleína (CeNMHT):** células AR42J no modificadas, incubadas 2 h en presencia de HT a una concentración 50  $\mu\text{M}$ , seguido de una incubación con ceruleína a dosis  $1 \times 10^{-8}$  M durante las 24 horas anteriores a la realización de las determinaciones.
- **Grupo Modificado Oleico (MO):** Células AR42J con membranas plasmáticas ricas en ácido oleico.
- **Grupo Modificado Oleico tratado con Ceruleína (CeMO):** Células AR4-2J con membranas plasmáticas ricas en ácido oleico, e incubadas con ceruleína  $1 \times 10^{-8}$  M durante las 24 horas anteriores a la realización de las determinaciones.
- **Grupo Modificado Oleico + HT (MOHT):** Células AR42J con membranas plasmáticas ricas en ácido oleico, e incubadas 2 h en presencia de HT a una concentración 50  $\mu\text{M}$ .
- **Grupo Modificado Oleico + HT tratado con Ceruleína (CeMOHT):** Células AR42J con membranas plasmáticas ricas en ácido oleico, incubadas 2 h en presencia de HT a una concentración final en el medio de 50  $\mu\text{M}$  seguido de una incubación con ceruleína  $1 \times 10^{-8}$  M durante las 24 h anteriores a la realización de las determinaciones.
- **Grupo Modificado n-3 (Mn-3):** Células AR42J con membranas plasmáticas ricas en ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena larga (PUFAs n-3). En concreto, ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA).
- **Grupo Modificado n-3 tratado con Ceruleína (CeMn-3):** Células AR42J con membranas plasmáticas ricas en ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena larga, en concreto, EPA y DHA, e incubadas con ceruleína  $1 \times 10^{-8}$  M durante las 24 horas anteriores a la realización de las determinaciones.

- **Grupo Modificado n-3 + HT (Mn-3HT):** Células AR42J con membranas plasmáticas ricas en PUFAs n-3, en concreto, EPA y DHA, e incubadas 2 h en presencia de HT a una concentración 50  $\mu\text{M}$ .
- **Grupo Modificado n-3 + HT tratado con Ceruleína (CeMn-3HT):** Células AR42J con membranas plasmáticas ricas en ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena larga, en concreto, EPA y DHA, incubadas 2 h en presencia de HT a una concentración 50  $\mu\text{M}$ , seguido de una incubación con ceruleína  $1 \times 10^{-8}$  M durante las 24 h anteriores a la realización de las determinaciones.

1

### ***Modificación del Perfil Lipídico***

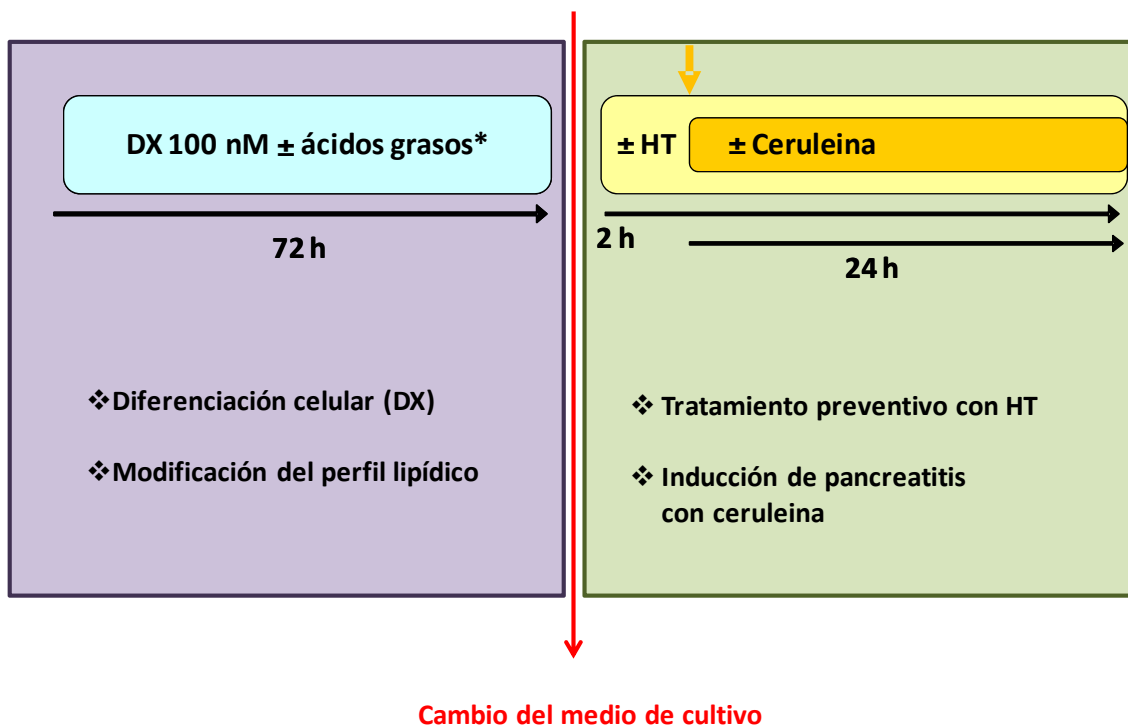
Para poder estudiar la influencia de la modificación del perfil lipídico de las membranas de las células AR4-2J sobre el proceso oxidativo-inflamatorio desencadenado por la ceruleína, durante el proceso de diferenciación con DX (72 h), se incorporaron los ácidos grasos al medio de cultivo según lo descrito por Chow y cols. (1991) con algunas modificaciones (figura 10).

Se preparó una solución stock de 100 mM en etanol para cada ácido graso. Se añadieron alícuotas del ácido graso correspondiente al FCS y se incubó a 37°C durante una hora, sonicando en este período (3 pulsos de 30 s cada vez) con el objeto de acomplejar la albúmina del suero con el ácido graso. Este suero enriquecido, con ácido oleico o con la mezcla EPA/DHA, fue el que se le añadió al medio de cultivo, quedando el ácido oleico, a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$ , y en el caso de la mezcla EPA/DHA a 25  $\mu\text{M}$  (EPA 15  $\mu\text{M}$  y DHA 10  $\mu\text{M}$ ). En el caso de las células no modificadas fueron incubadas en el medio de cultivo intacto, con el FCS sin modificar.

Se comprobó la viabilidad de las células suplementadas con ácidos grasos y no suplementadas mediante el método exclusivo de Trypan blue, encontrando una viabilidad para ambas del 95-98%.

---

<sup>1</sup> Para el estudio de ciertos parámetros, de manera excepcional, se indujo el modelo de pancreatitis con ceruleína  $10^{-7}$  M, además de  $10^{-8}$  M. En estos casos se especificará añadiendo el correspondiente prefijo Ce-7 o Ce-8 a cada uno de los grupos experimentales. Siempre y cuando no se especifique, se tratará de ceruleína  $10^{-8}$  M.



**Figura 10.** Esquema temporal del diseño experimental y el objetivo de cada tratamiento.

### *Diseño del Modelo*

Pasadas las 72 horas correspondientes a la incubación con dexametasona y medio enriquecido en sus correspondientes ácidos grasos, se renovó el medio de cultivo por otro nuevo, esta vez sin dexametasona ni ácidos grasos. En estas condiciones se incubaron las células durante las 26 horas anteriores a cada experimento. Durante este tiempo, en el caso de los grupos CeNMHT, CeMOHT y CeMn-3HT, las dos primeras horas se incubaron en dicho medio pero en presencia de HT (a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$ ), y pasado ese tiempo se les añadió ceruleína (a una concentración final en el medio de cultivo de  $10^{-8}$  nM), y se incubaron durante las 24 horas siguientes; en el caso de los grupos NMHT, MOHT y Mn-3HT, las dos primeras horas se incubaron con HT (siempre a la misma concentración final) y pasado este tiempo no se les añadió la ceruleína; para los grupos CeNM, CeMO y CeMn-3, durante las dos primeras horas se incubaron en medio de cultivo sin HT y pasado este tiempo se le adicionó la ceruleína (siempre a la misma concentración final), incubándose durante las 24 horas siguientes. Los grupos NM, MO y Mn-3 se incubaron durante 26 horas en medio de cultivo intacto (figura 11). Tanto el HT como la ceruleína fueron obtenidos de Sigma.

Para la determinación del NF- $\kappa\text{B}$ , las células se incubaron en presencia de ceruleína solo durante 30 minutos.



· Medio RPMI 1640 + 2mM glutamina + 10% FCS; 37°C / 5% CO<sub>2</sub>

Figura 11. Esquema del diseño experimental empleado en tratamientos crónicos.

## **Determinación del Perfil Lipídico de Membrana**

Se determinó el perfil lipídico de membrana con el fin de comprobar que se habían adaptado a los ácidos grasos que se añadieron al medio de cultivo. Esta determinación se llevó a cabo en dos pasos. Primero se aislaron las membranas mediante el procedimiento a continuación descrito, y después se prosiguió con la extracción lipídica y transesterificación de los ácidos grasos presentes en las mismas, y posterior análisis por cromatografía.

### ***Aislamiento de las Membranas***

Las membranas de las células AR42J se obtuvieron según lo descrito por Ferreira y cols. (2002) con algunas modificaciones.

### ***Reactivos***

- ❖ Solución amortiguadora: Tris (Trizma base Reagent grade) 50mM, ácido etilendiaminotetraacético sal disódica 2-hidrato (EDTA) 1mM (Sigma ref. E4884), KCl 154mM, preparada en agua destilada y pH 7,4.
- ❖ Buffer fosfato salino 1X (PBS).

### ***Procedimiento***

Se partió de una cantidad aproximada de  $22 \times 10^6$  células. Se despegaron las células adheridas al frasco mediante golpeo, seguido de un suave pipeteo, y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el medio de cultivo (sobrenadante) y se lavaron las células con PBS atemperado a 37°C, resuspendiendo el botón en 3 ml de solución amortiguadora. Las células fueron homogeneizadas en esta solución con un homogeneizador tipo Potter con pistón de teflón durante unos 15 min. Transcurrido este tiempo, el homogenizado se centrifugó a 600 x g durante 10 min y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 100000 x g durante 1 h. El pellet, donde se encontraban las membranas plasmáticas ya aislada, se resuspendió en 1 ml de solución amortiguadora que fue congelado y mantenido a -80°C hasta su análisis.

## ***Extracción Lipídica y Transesterificación De Ácidos Grasos***

La determinación del perfil de ácidos grasos de las membranas celulares se llevó a cabo mediante la extracción y transmetilación, en un solo paso, según lo descrito por Lepage & Roy (1986). A través de esta transesterificación de los ácidos grasos con grupos metilo, éstos se convierten en una forma en la que ya son volátiles y pueden ser detectados por el detector de llama del cromatógrafo de gases.

### *Reactivos*

- ❖ Metanol:benceno 4:1 (v/v)
- ❖ Cloruro de acetilo
- ❖  $K_2CO_3$  al 6% en agua desionizada.
- ❖ Hexano
- ❖ Solución patrón de esteres metílicos de 37 ácidos grasos puros (Supelco 37 component FAME Mix (Supelco)ref. 47885-U)

### *Procedimiento*

Se prepararon alícuotas de 200  $\mu$ l de muestra de membranas aisladas, en tubos de vidrio. Se añadió 4 ml de metanol:benceno 4:1, a cada tubo, mezclando mediante volteo. A esta mezcla se le adicionaron 200  $\mu$ l de cloruro de acetilo lentamente, en continua agitación y bajo la campana de extracción de gases., Los tubos cerrados herméticamente se incubaron a 100°C durante 1 h, con objeto de conseguir la transesterificación de los ácidos grasos con grupos metilo. Pasado este tiempo, se enfriaron los tubos en hielo y se les añadieron 5 ml de  $K_2CO_3$ , al 6%, para detener la reacción de transesterificación y neutralizar la mezcla. Se agitó mediante volteo y se centrifugó a 1700 x g durante 10 min a 4°C, para conseguir la separación de las dos fases. Con la ayuda de una pipeta pasteur microcapilarizada se recogió la fase superior, fase bencénica, que contenía los esteres metílicos de los ácidos grasos. Dicha fase se evaporó bajo una corriente de nitrógeno para evitar la oxidación de los ácidos grasos, obteniéndose un extracto seco. Finalmente, cada extracto se resuspendió en 50  $\mu$ l de hexano y se envasaron en microviales de vidrio, quedando dichos esteres metílicos preparados para ser cuantificados mediante cromatografía de gases.

La cuantificación de los esteres metílicos de los ácidos grasos se realizó por cromatografía gas-líquido. Se inyectó 1 µl de la muestra en 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). Previamente a la inyección de las muestras, y diariamente, se pinchó un patrón de distintos ácidos grasos (14:0 a 22:6 n-3), para la posterior identificación de los picos.

Las condiciones de análisis fueron las siguientes:

➤ Flujo de los gases del detector:

Hidrógeno 30 ml/min.

Aire 400 ml/min

Nitrógeno 4 ml/min

➤ Flujo del gas portador:

Flujo de entrada 60 ml/min

Flujo en columna 1 ml/min

La relación de participación utilizada fue 60:1

➤ Programa de temperaturas:

El desarrollo cromatográfico se realizó en gradiente de temperatura durante un tiempo total de 40 min. La rampa de temperaturas fue la siguiente:

5 min hasta 160 °C

6 min hasta 195 °C

6 min hasta 220 °C

6 min hasta 230 °C

12 min a 230 °C

5 min hasta 160 °C

La identificación cromatográfica de los ácidos grasos se realizó por comparación de los tiempos de retención obtenidos a partir de una solución patrón de esteres metílicos de 37 ácidos grasos puros (Supelco 37 component FAME Mix (Supelco)ref. 47885-U)

Los resultados se expresaron como porcentaje relativo normalizado, del área registrada para el total de los picos correspondientes a los esteres metílicos de los ácidos grasos. 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.

En base a esta cuantificación, se calcularon los siguientes de índices:

- Índice de ácidos grasos saturados (**SFA**): suma de todos los ácidos grasos saturados.
- Índice de ácidos grasos insaturados (**UFA**):  $100 - \text{SFA}$
- Índice **MUFA**: suma de todos los ácidos grasos monoinsaturados.
- Índice **DUFA**: suma de todos los ácidos grasos diinsaturados.
- Índice **MUFA/DUFA**: cociente entre ácidos grasos monoinsaturados y diinsaturados.
- Índice **PUFA**: suma de todos los ácidos grasos poliinsaturados.
- Índice (**MUFA/PUFA**): cociente entre ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados.
- Índice **PUFA n-6**: suma de todos los ácidos grasos poliinsaturados n-6.
- Índice **PUFA n-3**: suma de todos los ácidos grasos poliinsaturados n-3.



- Índice **PUFA>18 C n-6**: suma de todos los ácidos grasos poliinsaturados n-6 con un número de carbonos mayor a 18.
- Índice **PUFA>18 C n-3**: suma de todos los ácidos grasos poliinsaturados n-3 formados por un número de átomos carbonos mayor a 18.
- Índice **SFA/UFA**: cociente entre ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados.
- Índice **SFA/MUFA**: cociente entre ácidos grasos saturados y ácidos grasos monoinsaturados.
- Índice de insaturación (**UI**). Calculado según la siguiente fórmula:

$$UI = \frac{[\sum(\text{contenido ácidos grasos} \times \text{n}^\circ \text{dobles enlaces})]}{SFA}$$

## Determinación de la Concentración de $Ca^{2+}$ citosólico.

Se basa en introducir dentro de las células una sonda fluorescente para poder determinar, mediante fluorimetría, la concentración de calcio intracelular. La sonda usada en este caso fue el **Fura-2-acetoximetil ester**, a menudo abreviado como Fura-2AM. Este derivado es permeable a la membrana plasmática. Cuando se añade Fura-2AM a la suspensión celular, éste atraviesa la membrana de cada célula, y una vez dentro los grupos acetoximetilos son eliminados tras la acción de esterasas celulares. La eliminación de los esteres acetoximetilos genera “Fura-2”.

El Fura-2 presenta dos especies moleculares, una unida al  $Ca^{2+}$ , y otra en forma libre, no unida. La forma unida al calcio presenta un máximo de excitación a 340 nm, mientras que la otra forma no unida presenta un máximo de excitación a 380 nm. En ambos casos el máximo de radiación emitida aparece a 510 nm. El cociente entre las emisiones a esas longitudes de onda se correlaciona directamente con la cantidad de calcio intracelular. Es

decir, el cociente F340/F380, el cual determina el “ratio” de la fluorescencia a ambas longitudes de onda, permite el cálculo de la concentración de calcio basado en ese “ratio”.

## ***Reactivos***

- ❖ Solución Na-HEPES (tabla 1)
- ❖ Sonda Fura 2-AM (Ref. F1201 Invitrogen): 1 mM en dimetil sulfóxido (DMSO)
- ❖ Solución KRH base (Krebs-Ringer-Hepes Base)
- ❖ CCK-8 sulfatada (Ref. C2175 Sigma)
- ❖ Digitonina (Ref. D5628 Sigma)  $10^{-3}$ M preparada en agua destilada.
- ❖ Solución de EGTA/Tris: EGTA (Ref. E4378) 0.04 M en Trizma base(Sigma) 0.3 M pH 8.7

## ***Procedimiento***

Se partió de una cantidad de  $6 \times 10^6$  células AR42J por cada frasco. Se golpearon las células, seguido de un suave pipeteo, para poder despegarlas de la base del frasco. Una vez despegadas se pasaron a un tubo cónico y se centrifugaron a  $124 \times g$  durante 5 minutos a  $8^\circ\text{C}$ , con el fin de eliminar el medio de cultivo. Se lavó el pellet celular con solución Na-HEPES (tabla 2), centrifugando en las mismas condiciones anteriores. Una vez eliminado el sobrenadante, el pellet se resuspendió en solución Na-HEPES y se añadió la sonda Fura 2-AM, encontrándose en la suspensión celular a una concentración final de  $2 \mu\text{M}$ . El proceso de carga de este derivado consistió en una incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos en agitación, lo cual favoreció la entrada del ester al citosol. Posteriormente se centrifugó, siempre en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet celular con una solución Na-HEPES pero sin albúmina sérica bovina (BSA), ni Inhibidor de Tripsina (STI), conocida como solución KRH base (Krebs-Ringer-Hepes Base), con el fin de eliminar los restos de sonda del medio extracelular. Finalmente, se obtuvo una suspensión de células viables en esta solución KRH base.

Antes de proceder a la determinación en el espectrofluorímetro, se dejó la suspensión celular entre 10-15 min a temperatura ambiente para completar la ruptura del Fura -2AM (éster) en su forma iónica (forma capaz de unirse al  $\text{Ca}^{2+}$ ). Pasado este tiempo, se añadieron alícuotas de 1.9 ml de suspensión celular a una cubeta de cuarzo situada en el espectrofluorímetro, manteniéndose dicha suspensión a una temperatura constante de 37°C y con agitación suave durante todo el experimento. La duración de cada experimento fue de 900 segundos (s), registrándose lecturas cada 1.9 s.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (mM)
<b>NaCl</b>	130
<b>KCl</b>	5
<b>HEPES</b>	20
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,2
<b>MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>	1
<b>Glucosa</b>	10
<b>CaCl<sub>2</sub> (1M)</b>	1
<b>Albúmina sérica bovina (BSA)</b>	0,20% (p/v)
<b>Inhibidor de Tripsina de Soja (STI)</b>	0,01% (p/v)

**Tabla 1.** Solución Na-HEPES (pH 7,4).

El experimento se dividió en tres etapas:

- 0-200 segundos: en esta etapa se registraron los valores basales de Calcio citosólico (línea base).
- 200-600 segundos: en esta etapa se registraron los valores de calcio citosólico tras la adición a los 200 s del secretagogo CCK-8, alcanzando en la suspensión celular una concentración final de  $10^{-9}\text{M}$ .

- 600-900 segundos: Etapa de calibrado del experimento. Tras la adición a los 600 s de 200  $\mu\text{l}$  de digitonina  $10^{-3}\text{M}$  preparada en agua destilada y la adición a los 800 s de 300  $\mu\text{l}$  de la solución EGTA/Tris. A través de la adición de la digitonina se pudo establecer el valor máximo y mediante la adición de EGTA/Tris se estableció el valor mínimo. La concentración final en la suspensión celular de la digitonina fue de 90  $\mu\text{M}$ , y de la solución EGTA/Tris 5 mM.

La fluorescencia fue medida a 37 °C en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 B con excitación a 340 y 380 nm, y emisión a 510nm.

Los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  se integraron a través del software específico FL Winlab (Perkin Elmer) que incorpora el aparato, de acuerdo con Grynkiewicz et al. (1985). Se usó un valor de  $K_d$  del complejo fura- $\text{Ca}^{2+}$  de 224 nM.

Los resultados de estos experimentos se expresan gráficamente como evolución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  a lo largo del tiempo del experimento. Para calcular el **área bajo la curva (ABC)** de la respuesta de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , se promediaron los valores correspondientes a la línea base (antes del estímulo) y esto fue restado a cada uno de los valores tras el estímulo. La suma de estos datos obtenidos tras esta resta sería el área bajo la curva. Para el cálculo de las áreas se usó siempre el mismo número de puntos.

## Determinación de la Secreción de Amilasa

### *Incubación de las células AR42J con CCK-8*

La CCK es un potente estimulador de la secreción enzimática (Grossman, 1977). Este es el principal efecto sobre el páncreas exocrino. De modo que las células AR42J fueron incubadas en presencia de concentraciones crecientes ( $10^{-12}$  hasta  $10^{-7}$ ) de CCK-8 (CCK-8 sulfatada ref. C2175 Sigma) con objeto de estudiar posibles desplazamientos de la típica curva de CCK-8.

### *Reactivos*

- ❖ CCK-8 sulfatada (Ref. C2175 Sigma)
- ❖ Solución de incubación (tabla 2)

- ❖ Tampón fosfatos de Bernfeld: fosfato sódico 20 mM y NaCl 6.7 mM, pH 6.9 a 37°C (Bernfeld, 1955).
- ❖ Solución de lisis: tritón X-100 al 2% en tampón fosfatos de Bernfeld.

### *Procedimiento*

Se partió de  $12 \times 10^6$  células, todas ellas pertenecientes al mismo grupo experimental. Se golpearon suavemente los frascos, seguido de un suave pipeteo, para despegar las células adheridas. Se centrifugaron a 124 x g durante 5 minutos. Se hizo un lavado con solución de incubación (tabla 2) para eliminar completamente los restos de medio de cultivo y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones anteriores. Una vez retirado el sobrenadante se resuspendió el *pellet* celular en 35 ml de solución de incubación, previamente atemperada a 37°C. De esta suspensión celular se tomaron alícuotas de 450  $\mu$ l para ser incubadas a 37°C durante 50 minutos, con las diferentes concentraciones de CCK-8, y en agitación suave, según la tabla 3, y en agitación suave.

Producto	Concentración
Glucosa	11,67 mM
NaCl	99,27 mM
KCl	5,97 mM
Piruvato	4,97 mM
Fumarato diNa	4,29 mM
Glutamato monohidratado	4,92 mM
Sol. Aminoácidos BME* (x50)	0,42 ml/l
HEPES	24,80 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,17 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM
Sol. Vitaminas (x100)	100 $\mu$ l/l
Glutamina	0,31 g/l
Inhibidor de tripsina	0,097g/l
BSA	1%
CaCl <sub>2</sub>	1 M

Tabla 2. Solución de incubación

Para poder calcular la actividad enzimática total y la actividad enzimática de fondo en el sobrenadante, antes de iniciar la incubación se prepararon dos clases de tubos por cada tanda: **tubos cero** y **tubos totales**. En los tubos cero se añadieron 450  $\mu\text{l}$  de suspensión celular + 55  $\mu\text{l}$  de solución de incubación, se centrifugaron a 957 x g durante 2 minutos y se recogió el sobrenadante para la posterior determinación de la actividad enzimática de fondo. En los tubos totales, además de lo presente en los tubos cero, se añadieron 505  $\mu\text{l}$  de solución de lisis y se agitaron mediante volteo para favorecer la lisis celular. En estos totales se determinó posteriormente la actividad enzimática total.

	<b>Tanda 1</b>	<b>Tanda 2</b>	<b>Tanda 3</b>	<b>Tanda 4</b>
<b>1</b>	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación
<b>2</b>	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-5}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-5}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-5}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-5}$ M
<b>3</b>	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-6}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-6}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-6}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-6}$ M
<b>4</b>	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-7}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-7}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-7}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-7}$ M
<b>5</b>	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-8}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-8}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-8}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-8}$ M
<b>6</b>	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-9}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-9}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-9}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-9}$ M
<b>7</b>	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación
<b>8</b>	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-5}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-5}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-5}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-5}$ M
<b>9</b>	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-6}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-6}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-6}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-6}$ M
<b>10</b>	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-7}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-7}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-7}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-7}$ M
<b>11</b>	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-8}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-8}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-8}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-8}$ M
<b>12</b>	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-9}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-9}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-9}$ M	50 $\mu\text{l}$ sol. incubación + 5 $\mu\text{l}$ CCK $10^{-9}$ M
<b>13</b>	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación	55 $\mu\text{l}$ sol. incubación

**Tabla 3.** Por cada tanda hay 13 tubos, los tubo 2, 3, 4, 5 y 6 son células en solución de incubación incubadas a 37°C durante 50 minutos en agitación suave, con las diferentes concentraciones de CCK-8. Los tubos 8, 9, 10, 11 y 12, son repeticiones de los 5 tubos anteriores. Los tubos 1, 7 y 13 contienen células en las mismas condiciones pero no son estimuladas por CCK-8, en ellos se ve la secreción basal de amilasa, esto es útil para determinar la secreción de amilasa neta. Con esto conseguimos para cada concentración de CCK-8 un n de 8 por experimento. Puesto que por cada grupo experimental, se hicieron dos experiencias, obtenemos un n total de 16 para cada grupo experimental estimulado con una determinada concentración de CCK-8.

Tras los 50 minutos de incubación, las células fueron centrifugadas, a 957 x g durante 2 min y se recogió el sobrenadante, donde se encuentra la amilasa liberada al medio tras la estimulación con CCK-8.

### ***Determinación de la actividad amilásica***

Dado el carácter primordialmente secretor de las células AR42J diferenciadas, la determinación de este parámetro es imprescindible para conocer la existencia de alguna alteración en la funcionalidad celular. De modo, que tras la incubación con las diferentes concentraciones de CCK-8, 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. La maltosa liberada se cuantificó por comparación con una curva patrón de maltosa.

### ***Reactivos***

- ❖ Tampón fosfatos de Bernfeld: fosfato sódico 20 mM y NaCl 6,7 mM, pH 6.9 a 37°C (Bernfeld, 1955).
- ❖ Solución de almidón al 1%: almidón de patata soluble de Sigma (ref. S-2630) en tampón fosfatos de Bernfeld.
- ❖ Reactivo de maltosa (tabla 4).
- ❖ Maltosa (ref. M-5885 de Sigma).

### ***Procedimiento***

Los sobrenadantes de las muestras incubadas y los tubos cero, fueron diluidos con tampón fosfatos en una relación 1/2; y los sobrenadantes de los tubos totales fueron diluidos en una relación 1/10, también con tampón fosfatos, pero como éstos ya estaban diluidos 1/2 ya que

se les añadió la solución de lisis, la dilución final es 1/20. Quedando por tanto una dilución final de 2:2:20 (1 a 13: cero: totales). De estas diluciones, atemperadas previamente a 37°C, se repartieron alícuotas de 200 µl en tubos de vidrio y se les añadieron 200 µl de solución de almidón al 1% (previamente atemperada a 37°C). Esta mezcla de 400 µl por tubo, fue incubada a 37°C con agitación suave durante exactamente 15 minutos. Tras la incubación se añadieron 400 µl de reactivo de maltosa a cada tubo dándole un color amarillento. De forma paralela, se prepararon dos tubos más que no fueron incubados a 37°C, y que fueron utilizados como:

- a. Tubo blanco reactivo (RB), al cual se le añadió 400 µl de Buffer fosfatos más 400 µl de reactivo de maltosa (tabla 4). Este tubo indicó el color que de por sí tiene ya el reactivo de maltosa (amarillo).
- b. Tubo blanco sustrato (SB), el cual contenía 200 µl de buffer fosfatos, 200 µl de solución de almidón al 1%. Este tubo se usó para conocer el background (ruido o fondo) de maltosa que tuviera la solución de almidón a causa de una hidrólisis espontánea.

Seguidamente, todos los tubos (muestras, SB y RB) fueron tapados e incubados en un baño de agua a una temperatura entre 95-100°C durante 10 minutos. El color de la disolución cambió de amarillo a rojo. Pasado este tiempo, se metieron todos los tubos en hielo, se diluyeron cada uno con 8 ml de agua destilada y se mezclaron por volteo.

**Reactivo de maltosa:**

-2 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (D-0550 de Sigma) y 60 g de tartrato sódico-potásico tetrahidrato (S-2377 de Sigma).

-Disolver el ácido dinitrosalicílico y el tartrato en aproximadamente 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

Se conserva a T<sup>a</sup> ambiente y tapado en un recipiente topacio, ya que es sensible a la luz.

**Tabla 4.** Preparación del reactivo de Maltosa.



Se repartieron alícuotas de 200 µl en cada pocillo de la placa y se midió la densidad óptica (DO) 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.

A las DO obtenidas de las muestras (4 tandas, incluyendo los cero y totales) se les restó el valor del tubo SB para restar el background.

La cantidad de maltosa formada en cada muestra por acción de la actividad amilásica presente en ella se conoció mediante la realización de una curva patrón de maltosa realizada a partir de un stock de maltosa de 8mg/ml. Sin embargo, aunque la concentración de maltosa no es una función lineal de la actividad amilásica, pero sí lo es K (constante de reacción para la hidrólisis de almidón), con lo que se calculó K en cada muestra, mediante la aplicación de la siguiente fórmula (Willstatter, et al., 1923; Lagerlof, 1942):

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

Donde:

t= tiempo de incubación

a= máxima cantidad de maltosa que se podría liberar a partir del almidón en nuestra muestra

Basándonos en que 1 mg de almidón puede liberar como máximo 0.75 mg de maltosa (Willstatter et al., 1923), en nuestro caso **a= 1,5 mg de maltosa**.

mi= mg de maltosa que se han producido realmente en nuestra muestra, esto fue calculado a partir de la curva patrón de maltosa.

La actividad amilásica es expresada como % de amilasa liberado al sobrenadante durante la incubación respecto al contenido de amilasa total (Martínez et al. 2004). Para expresarlo así trabajamos con K, que si que varía linealmente con la actividad amilásica. Se multiplicó k por su correspondiente factor de dilución y con esos valores se calculó el % de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% = [(k_i - k_{\text{cero}}) / (k_{\text{total}} - k_{\text{cero}})] \times 100$$

Donde:

$K_i$ : k calculada para el tubo problema (1-13)

$K_{total}$ : k calculada para el tubo total

$K_{cero}$ : k calculada para el tubo cero

También se ha calculado la amilasa secretada neta, es decir, la diferencia entre la amilasa liberada por la correspondiente dosis de Cck-8 y la amilasa basal (no estimulada).

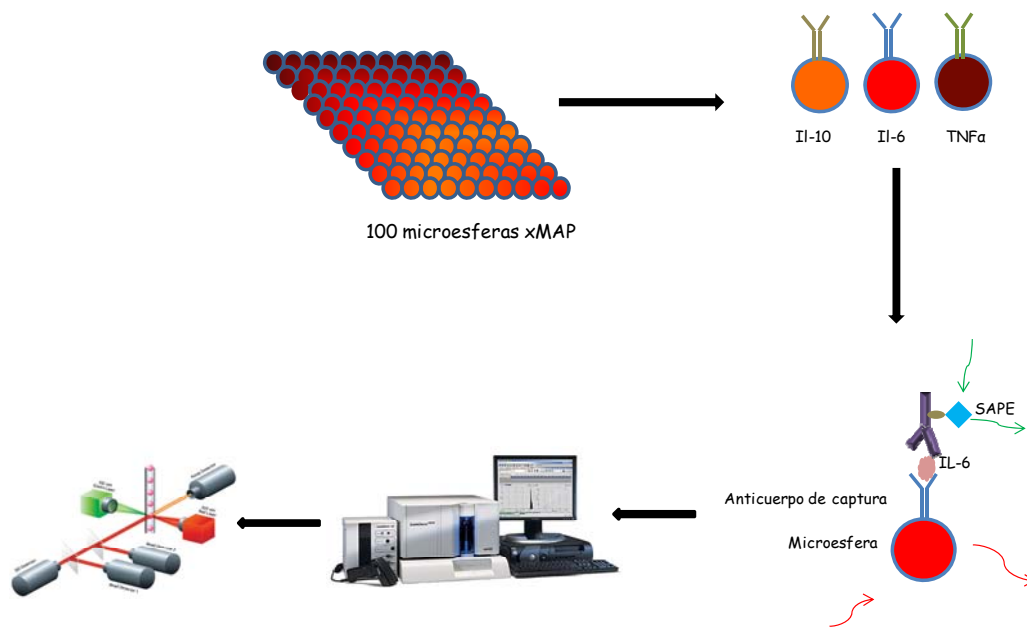
## **Determinación de producción de Mediadores Inflamatorios (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ ).**

La determinación de la interleucina-1 $\beta$  (IL- $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL10) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), se hizo mediante el kit *MILLIPLEX<sup>TM</sup> MAP RAT CYTOQUINE/CHEMOKINE 96 Well Plate Assay* de Millipore, basado en la Tecnología Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup> de Corporation.

La tecnología xMAP se basa en la aplicación de citometría de flujo para la detección de “beads”, microesferas, que poseen internamente un código de color proporcionado por dos colorantes fluorescentes. A través de concentraciones precisas de estos dos colorantes se crea una combinación diferente de colores, rojo e infrarrojo, que van desde el 1% versus 99% hasta el 99% versus 1%. Como resultado aparece un conjunto de 100 microesferas coloreadas distintivamente, cada una de las cuales está recubierta por un anticuerpo de captura específico ante un analito particular presente en la muestra problema.

La gran ventaja que proporciona xMAP es que permite detecciones múltiples (hasta 100 analitos teóricamente) dentro de un mismo pocillo a diferencia de otras técnicas similares como el ELISA en sandwich. Además, la reacción se hace en una solución, los anticuerpos nunca se encuentran adheridos a la superficie.

Una vez capturado el analito por la microesfera, se añade a la reacción otro anticuerpo marcado con biotina, que también se une al analito. Mediante la adición del conjugado estreptavidina-ficoeritrina, conocido como SAPE o revelador (último componente que se añade a la reacción), se obtienen dos tipos de fluorescencia (una correspondiente a la microesfera y otra al revelado con SAPE). A su vez, el citómetro es capaz de distinguir ambos tipos de fluorescencia puesto que tiene dos láseres: uno rojo que detecta el tipo de microesfera y otro verde que detecta la fluorescencia asociada al revelado con SAPE (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema de la tecnología xMAP.

Finalmente el proceso de análisis se lleva a cabo en un equipo Luminex (figura 13), el cual consta de:

1. Un sistema de fluidos que toma líquido del sistema (un PBS modificado conocidos como “Sheat Fluid) y que se conecta al citómetro.

2. El citómetro, que consta de una aguja que absorbe la muestra que contiene las microesferas y así procede a su lectura. El citómetro detecta a través de sus dos láseres el tipo de microesfera y la fluorescencia asociada al revelado con SAPE.
3. Una plataforma por donde se inserta la placa.
4. Una CPU que alberga el software de inicio de protocolos, alineamientos de placas y análisis y ajuste de curvas de calibración.



Figura 13. Equipo Luminex 200™

## ***Reactivos***

- ❖ kit *MILLIPLEX<sup>TM</sup><sub>MAP</sub> RAT CYTOQUINE/CHEMOKINE 96 Well Plate Assay* de Millipore.
- ❖ Medio RPMI 1640 de Sigma.

## ***Procedimiento***

Se cultivaron  $6 \times 10^6$  células por frasco, en aproximadamente 10 ml de medio de cultivo. Se tomó 1ml de ese medio, se centrifugó a  $124 \times g$  durante 5 min. Posteriormente concentró 10 veces ese sobrenadante mediante liofilización y su reconstituyó en medio RPMI 1640.

La determinación de las citocinas presentes en estos sobrenadantes se realizó siguiendo el protocolo correspondiente al Kit *MILLIPLEX<sup>TM</sup><sub>MAP</sub> RAT CYTOQUINE/CHEMOKINE 96 Well Plate Assay* de Millipore. Básicamente se siguieron los siguientes puntos:

1. **Preparación de las microesferas.** Los 4 viales que contienen las microesferas destinadas a la detección de los 4 analitos (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$ ) que vamos a determinar, fueron sonicados durante 30 s en un baño sonicador (Branson Ultrasonic Bench Cleaner 200), seguido de una agitación mediante volteo durante 1 min, para conseguir una perfecta homogenización. Posteriormente, se tomaron 60  $\mu$ l de cada vial de microesferas y se mezclaron en un bote especialmente entregado por el Kit llevándose hasta 3 ml con Bead diluent.
2. **Preparación de los controles de calidad.** Existen dos controles de calidad, cada uno con un rango respecto a la concentración de analito presente. QC1, con una menor concentración y QC2, con una concentración mayor.
3. **Preparación de estándares:** se prepararon 6 estándares desde el vial original, reconstituido con agua desionizada, mediante diluciones seriadas de 1:4 con Assay Buffer, según las indicaciones del kit. Las concentraciones finales de cada una de las citocinas, en cada vial, aparecen en la tabla 5.
4. **Reparto de los reactivos y muestras en la placa.** Según lo que indica el protocolo del kit, primero, se repartieron los viales de los estándares, controles y assay Buffer en sus pocillos correspondientes. El Assay Buffer es el 0 pg/ml de nuestra curva estándar, que permite eliminar el background de los reactivos. Posteriormente se adicionaron los sobrenadantes problema en sus correspondientes pocillos y las microesferas. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.
5. **Incubación con los anticuerpos de captura.** Una vez añadidas las muestras, se incubó la placa, tapada y envuelta en papel de aluminio, entre 18-20 h a 4°C, en agitación constante y suave. Pasado este tiempo, se hicieron dos lavados mediante la adición de un tampón de lavado y su posterior eliminación mediante centrifugación, 1300 x g durante 5 min.
6. **Incubación con el anticuerpo marcado y revelado.** Tras los lavados, se procedió a la adición del anticuerpo marcado y se incubó durante 2 h en agitación a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió el revelador SAPE y se incubó durante 30 min en agitación y a temperatura ambiente. Se centrifugó en las mismas condiciones anteriores, se retiró el sobrenadante, se realizaron dos lavados. Finalmente, se añadieron 150  $\mu$ l del reactivo “Sheat fluid” a cada pocillo, cubriendo la placa con papel de aluminio e incubándola durante 5 min en agitación constante.

7. **Análisis.** El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo en el equipo Luminex 200™ v2.3 y software *Luminex Xponent*.

Se analizó la Intensidad Fluorescente Media (MFI) de cada uno de los datos usando una logística ponderada de 5 parámetros.

Viales estándar (STD)	Concentración de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$ (pg/ml)	Concentración de Leptina (pg/ml)
Original	20000	100000
STD1	5000	25000
STD2	1250	6250
STD3	312,5	1562,5
STD4	78,13	390,63
STD5	19,53	97,66
STD6	4,88	24,41

**Tabla 5.** Concentraciones resultantes de las citocinas en la curva estándar del kit Rat Cytokine/Chemokine (ref. RCYTO-80K)

## Determinación de la activación del Factor Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).

La activación del NF $\kappa$ B se analizó mediante la cuantificación, por un lado, de la concentración citosólica de las proteínas I $\kappa$ B $\alpha$  haciendo uso de la técnica Western blot, y por otro, de los niveles nucleares de la subunidad p65 del NF $\kappa$ B, mediante el kit comercial TransAM™ de Active Motif. Para ello, se realizó previamente la extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares por separado, con el kit *Nuclear Extract*, y su posterior cuantificación.

### ***Extracción de Proteínas***

Los extractos correspondientes a proteínas citoplasmáticas y nucleares se obtuvieron mediante el empleo del kit *Nuclear Extract* de Active Motif, permitiéndonos conseguir ambos extractos por separado.

Este kit emplea un tampón hipotónico que consigue que la membrana plasmática se vuelva frágil y un detergente que provoca la liberación de las proteínas citoplasmáticas hacia el sobrenadante manteniendo intacto el núcleo celular. Tras recoger la fracción citoplasmática se lisan los núcleos añadiendo un tampón de lisis que solubilizan las proteínas nucleares. Todo el proceso se lleva a cabo en presencia de inhibidores de proteasas.

### ***Reactivos***

- ❖ kit *Nuclear Extract* de Active Motif (ref. 40010).

### ***Procedimiento***

Se partió de una cantidad de  $9 \times 10^6$  células. Debido a que las células AR42J crecen en semisuspensión, no se pudo aspirar el medio y fue necesario el traslado a un tubo cónico, eliminando dicho medio de cultivo mediante centrifugación ( $124 \times g/5\text{min}$ ). Mediante el uso de un raspador, se despegaron las células adheridas al frasco con un tampón frío de PBS/inhibidor de fosfatasa, provisto por el kit, tal y como indica el protocolo adjuntado en el Kit. El pellet celular se resuspendió con el mismo tampón frío con el que se despegaron las células, y dicha suspensión se mezcló con las células despegadas en un tubo cónico de 15ml, previamente enfriado. Se añadió tampón frío hasta un volumen de 3ml. Se centrifugó a  $40 \times g$  durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se mantuvo el pellet celular en hielo. Dicho pellet se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de tampón hipotónico mediante un suave pipeteo y se traspasó a un tubo de microcentrífuga donde se incubó durante 15 minutos en hielo. Pasado este tiempo, se le añadió 25 $\mu\text{l}$  del detergente, se agitó mediante volteo durante 10 segundos y se centrifugó en una microcentrífuga previamente enfriada a 4°C a  $14000 \times g$  durante 30 s. En dicho sobrenadante se obtuvo la fracción citoplasmática, la cual se congeló y almacenó a -80°C.

El pellet nuclear se resuspendió en 50µl de tampón de lisis mediante pipeteo, se agitó por volteo, durante 10 segundos, y se incubó 30 minutos a 4°C en una plataforma giratoria. Pasado este tiempo, se volvió a agitar fuertemente y se centrifugó a 14000 x g durante 10 min, en una microcentrifuga previamente enfriada a 4°C. Finalmente, se recogió el sobrenadante (fracción nuclear) y se congeló y almacenó a -80°C, al igual que se hizo con la fracción citoplasmática.

### ***Cuantificación De Proteínas***

En todos los casos la concentración proteica de las muestras se determinó mediante el método de Bradford (1976), basado en el cambio del máximo de absorción de 465 a 595 nm tras la unión específica del colorante Azul Brillante Coomassie G-250 a las proteínas. El Azul Brillante Coomassie es un pigmento de tipo trifenilmetano aniónico, que se une de forma no covalente a los residuos de lisina de las proteínas. Este método depende, por tanto, de la unión cuantitativa de este colorante a una proteína desconocida y su posterior extrapolación en una curva patrón de BSA.

### ***Reactivos***

- ❖ Solución patrón de 0,5 BSA mg/ml preparada con agua MiliQ.
- ❖ Reactivo de Bradford (Coomassie brilliant blue solution Bradford de Bio-Rad).

### ***Procedimiento***

Se preparó una curva patrón con diferentes concentraciones de BSA, partiendo de una solución patrón de 0,5 mg BSA /ml (tabla 6). Las muestras de los diferentes extractos se diluyeron 160 veces para determinar su concentración de proteínas. Se repartieron en una placa de 96 pocillos, tanto la estándar como las muestras diluidas, por duplicado, y se añadió a cada pocillo el reactivo de Bradford. Se agitó vigorosamente en un agitador específico para placas y se incubó 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia en un lector de placas a 595 nm.



Tubo	[Proteína] (mg/ml)
A0	0,003125
A1	0,00625
A2	0,009375
A3	0,0125
A4	0,015625
A5	0,01875
A6	0,021875
A7	0,025
A8	0,028125
A9	0,03125
A10	0,034375
A11	0,0375
A12	0,040625
A13	0,04375
A14	0,046875

**Tabla 6.** Concentración de proteína presente en cada de los puntos que forman la curva patrón de BSA.

### ***Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE)***

La electroforesis en gel de poliacrilamida y en condiciones desnaturizantes, conocida como SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) es un proceso de separación electroforética que se lleva a cabo en condiciones desnaturizantes debido a la presencia de SDS y que permite la separación de proteínas. Se realizó con el fin de detectar y cuantificar la proteína IκBα de los extractos citoplasmático.

El SDS es un detergente aniónico que desnaturiza las proteínas, eliminando sus estructuras secundaria y terciaria, pero sin alterar los enlaces disulfuro. Al unirse a la proteína le confiere una carga negativa, que será proporcional a su masa (Shapiro et al., 1967; Weber et al., 1969; Laemmli 1970). Esta relación carga/masa que le proporciona el SDS, es aproximadamente uniforme para la mayor parte de las proteínas, de modo que se puede asumir que la distancia de migración en el gel está directamente relacionada sólo con

el tamaño de la proteína desplegada, lo que depende de la longitud de su cadena, el número de aminoácidos y la masa molecular.

La electroforesis se realizó en un sistema discontinuo mediante la utilización de dos geles contiguos; un gel separador situado en la parte inferior, donde se van a separar las proteínas, y un gel concentrador situado en la parte superior. Este sistema mejora significativamente la nitidez de la banda en el interior del gel. El gel concentrador posee un gran tamaño de poro que facilita la migración de todas las proteínas a la vez, permitiendo, en una primera etapa, que todas las proteínas se concentren en una única banda al llegar a la parte contigua del gel separador. Por su parte, el gel separador posee un tamaño de poro más pequeño, adecuado para separar las proteínas presentes en la muestra en función de su tamaño.

### *Reactivos*

- ❖ Agua MilliQ
- ❖ Tris/HCl 1,5 M pH 8,8
- ❖ SDS (Sigma)
- ❖ APS (Bio-Rad)
- ❖ TEMED (Bio-Rad)
- ❖ Tris/HCl 0,5M pH 6,8
- ❖ Acril-bisacrilamida 30%
- ❖ Tris/HCl 0,1M pH 6,8
- ❖  $\beta$ -mercaptoetanol
- ❖ Glicina de Sigma
- ❖ Tris
- ❖ Pirrolina de Sigma
- ❖ Marcador de peso molecular *Kaleidoscope Prestained Standards* de Bio-Rad

- ❖ Tampón de electroforesis 1X (tabla 9)
- ❖ Solución de ebullición (tabla 10)

### *Procedimiento*

1. **Preparación del gel separador.** Se preparó a una concentración del 12 % de poliacrilamida, lo que permite la separación de proteínas de peso molecular entre 14-200 KDa. Una vez mezclados todos los componentes, y añadidos en un tubo de plástico de 50 ml según el orden mostrado en la tabla 7, se depositó lentamente, ayudándonos con una pipeta, entre los cristales de la cubeta (montados según las instrucciones del fabricante). En nuestro caso se utilizó el sistema Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad) para geles de 7 x 8 cm con un grosor de 0,75 mm. Una vez alcanzada la altura deseada para dicho gel, se cubrió inmediatamente la solución con isobutanol con el fin de evitar la formación de burbujas. Se dejó como referencia el tubo plástico de 50 ml con la solución sobrante de gel, para saber cuándo había terminado de polimerizarse totalmente. Una vez polimerizado, se eliminó el isobutanol, se lavó con agua destilada y se secó con papel Whatman el espacio que quedaba entre los dos cristales.

	<b>Cantidad</b>
<b>Agua MiliQ</b>	4,575 ml
<b>Tris/HCl 1,5M pH 8,8</b>	2,625 ml
<b>SDS 10%</b>	105 $\mu$ l
<b>APS 10%</b>	75 $\mu$ l
<b>TEMED</b>	5,25 $\mu$ l

**Tabla 7.** Volumen necesario de los distintos componentes para la preparación de aproximadamente 10 ml de mezcla de gel de poliacrilamida al 12% (suficiente para dos geles de 7 x 8 cm y 0,75 mm de espesor).

2. **Preparación del gel concentrador.** Se añadieron todos los componentes según el orden mostrado en la tabla 8 en un tubo de plástico de 50 ml, se mezclaron mediante pipeteo y dicha mezcla se depositó lentamente, ayudándonos con una pipeta, entre los cristales de la cubeta sobre el gel separador. Una vez relleno, se introdujo el peine entre ambos cristales y se dejó polimerizar en las mismas condiciones anteriores. Este peine sirvió de molde para los pocillos donde se colocan las muestras. Una vez polimerizado, se retiró el peine suavemente para no romper los pocillos formados, y se introdujo el gel en la cubeta de electroforesis.

	<b>Cantidad</b>
<b>Agua MiliQ</b>	2,52 ml
<b>Tris/HCl 0,5M pH 6,8</b>	1 ml
<b>SDS 10%</b>	40 $\mu$ l
<b>APS 10%</b>	80 $\mu$ l
<b>TEMED</b>	4 $\mu$ l
<b>Acril-bisacrilamida 30%</b>	400 $\mu$ l

**Tabla 8.** Volumen necesario de los distintos componentes para la preparación de aproximadamente 4 ml de mezcla de gel concentrador (suficiente para dos gels de 7 x 8 cm y 0,75 mm de espesor).

3. **Electroforesis.** Se llenó la cubeta con tampón de electroforesis 1X (tabla 9). Se cargaron 24  $\mu$ g de proteína de los extractos citoplasmáticos en cada pocillo. La proteína iba disuelta en 20  $\mu$ l de una solución constituida por 10  $\mu$ l de muestra diluida en Tris/HCl 0,1M pH 6,8 + 10  $\mu$ l de solución de ebullición con  $\beta$ -mercaptoetanol (tablas 10 y 11), y esta solución se calentó a 100°C durante 2 minutos. En cada gel siempre se dejó un pocillo libre donde se añadieron 12  $\mu$ l del marcador de peso molecular *Kaleidoscope Prestained Standards* de Bio-Rad. Una vez cargados los pocillos, se introdujo la cubeta en una bandeja con hielo. Se conectaron los electrodos a una fuente de corriente continua a 55v aproximadamente unos 5 min, hasta que las muestras pasaron al gel concentrador. A continuación, se mantuvo a 75v durante 2 minutos, subiéndolo

finalmente a 100v. La electroforesis se detuvo cuando las bandas del marcador de peso molecular estuvieron perfectamente separadas.

Glicina de Sigma	57,6 g
Tris	12,1 g
SDS	4 g
Agua MiliQ	hasta un volumen final de 1000ml

**Tabla 9.** Tampón de Electroforesis 4X. Se prepara 4X para tener una mayor cantidad.

Glicerol 60% (Merk)	5 ml
Tris 2M pH 6,8	1 ml
SDS 10%	3 ml
Pirrolina 0,5% (Sigma)	0,2 ml
Agua MiliQ	8 ml

**Tabla 10.** Solución de ebullición. Esta solución se alicuotó y se conservó a -80°C

Solución de ebullición	250 µl
B-mercaptoetanol (Sigma)	37,5 µl

**Tabla 11.** Cantidades necesarias para la preparación de aproximadamente 500µl de solución de ebullición con β-mercaptoetanol para 20 muestras (2 geles).

## *Transferencia.*

La transferencia de proteínas desde un gel de poliacrilamida a un soporte sólido recibe el nombre de Western blot o transferencia de Western (Towbin et al., 1992). En este caso, el soporte sólido fueron membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF) de Millipore. De este modo, transferimos las proteínas que se han separado por electroforesis, desde el gel de poliacrilamida hacia un soporte sólido, que posteriormente incubaremos con los anticuerpos necesarios para la detección de la proteína en cuestión.

## *Reactivos*

- ❖ Metanol absoluto
- ❖ Tampón de transferencia (tabla 12)
- ❖ Azul de Comassie

## *Procedimiento*

En primer lugar, debido a que las membranas de PVDF son extremadamente hidrofóbica, se sumergieron durante 15 s en metanol absoluto para poder activarlas. A continuación, se sumergieron en agua miliQ durante 2 min para eliminar el metanol, y finalmente se equilibraron durante 5 minutos en tampón de transferencia (tabla 12).

Una vez finalizada la electroforesis se extrajo el gel con mucho cuidado de entre ambos cristales, se desechó la parte del gel concentrador y se sumergió el resto (gel separador) en tampón de transferencia de transferencia. Se cortaron 2 láminas de papel Whatman del tamaño de la porción resolutive del gel que va a ser transferida y se sumergieron junto con las esponjillas en tampón de transferencia.

Glicina	14,4 g
Tris	3,13 g
Metanol	200 ml
Agua MiliQ	hasta un volumen final de 1000 ml

**Tabla 12.** Tampón de Transferencia

La transferencia se llevó a cabo con un equipo Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad) (figura 14). Sobre la parte negra del adaptador se dispuso por orden:

- a) Esponjilla
- b) 1 lámina de papel Whatman
- c) Gel
- d) Membrana de PVDF
- e) 1 lámina de papel Whatman
- f) Esponjilla

Una vez puestas las piezas de Whatman (Sigma) se pasó un rodillo humedecido en tampón de transferencia para eliminar las burbujas. Se introdujo dicho montaje en la cubeta, se llenó de tampón de transferencia y se llevó a cabo a 100v durante 2 horas, en frío y con agitación.



**Figura 14.** Equipo Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad)

Finalizado el proceso, el gel se tiñó con Azul de Coomassie con el fin de evidenciar la eficiencia de la transferencia.

### ***Detección Inmunológica***

Inmovilizadas las proteínas en la membrana de PVDF, éstas se exponen a la unión de anticuerpos específicos para una determinada secuencia de aminoácidos (los denominados epítomos antigénicos).

### ***Reactivos***

- ❖ Leche desnatada en polvo
- ❖ BSA
- ❖ Tris buffer salino (TBS) 1X
- ❖ Tween-20 (Bio-Rad)
- ❖ Anti-Ik $\beta$ - $\alpha$  (Cell Signaling)
- ❖ PBS-Tween: Tween-20 al 0,05% v/v en PBS



❖ Anticuerpos secundarios conjugados-IRDye (Licor)

### *Procedimiento*

Al acabar la transferencia, las membranas se incubaron en una solución de leche desnatada en polvo preparada al 4% en PBS-Tween durante 30 minutos a 37°C. Con esto se consiguió el bloqueo de los sitios activos de la membrana que no han sido ocupados por proteína. Pasado este tiempo, se retiró la solución y se incubaron las membranas con el anticuerpo primario I $\kappa$ B $\alpha$  diluido 1:500 en BSA 5% (m/v), TBS 1X, 0,1% Tween-20 durante 18 horas a 4°C y en agitación.

Pasado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, y tras atemperar la membrana a temperatura ambiente durante 30 min, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-Tween, y se procedió a la incubación de la membrana con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente. La dilución ensayada del anticuerpo secundario conjugado-IRDye (verde), fue de 1:10000.

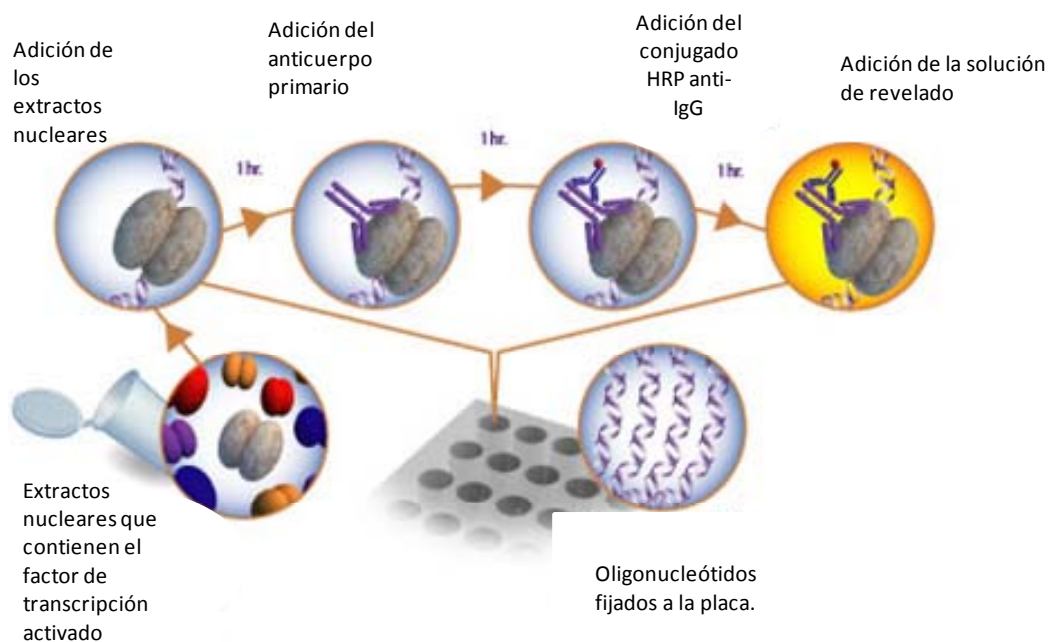
La detección y cuantificación de las proteínas se llevó a cabo en un sistema *Odyssey Image Scanner System* (Licor Biosciences, Cambridge, UK), con su propio programa de cuantificación *the Odyssey quantification software*.

Con el fin de normalizar, las membranas que previamente se había utilizado para la cuantificación de I $\kappa$ B $\alpha$ , se incubaron de nuevo pero con el anticuerpo anti- $\beta$ -Tubulin III diluido 1:50 durante 2 h a temperatura ambiente, el cual fue detectado con el anticuerpo secundario conjugado-IRDye (rojo) diluido 1:20000.

### ***Cuantificación del p65***

La activación del NF- $\kappa$ B se determinó, además de por las concentraciones citosólicas de I $\kappa$ B $\alpha$  mediante Western blot como se ha explicado antes, a través de la detección y cuantificación de la subunidad p65 en los extractos nucleares que se obtuvieron anteriormente de cada uno de los grupos experimentales. Esta cuantificación se llevó a cabo mediante el kit comercial *TansAM<sup>TM</sup> NF $\kappa$ B Chemi p65/p50/p52* de Active Motif (Catalogo N°. 40097 & 40597).

Consiste en la detección y cuantificación de la subunidad p65 a través de una técnica basada en ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El kit contiene una placa de 96 pocillos, los cuales contienen inmovilizada la secuencia de oligonucleótidos consenso del NF- $\kappa$ B (5'-GGGACTTTC-3'). De modo que la subunidad p65 activada que se encuentre en las muestras de los extractos nucleares, se unirán a estos oligonucleótidos. Esta unión se detecta a través de un anticuerpo primario que reconoce un epítipo de p65 que está accesible solo cuando el NF- $\kappa$ B se encuentra activado y unido a su ADN diana, y mediante un anticuerpo secundario conjugado con HRP que proporciona una lectura quimioluminiscente, fácilmente cuantificada por luminiscencia (figura 15).



**Figura 15.** Imagen de los pasos a seguir en la detección nuclear de la subunidad p65 del NF $\kappa$ B activado. Secuencia de los acontecimientos que tienen lugar dentro del pocillo.

## *Reactivos*

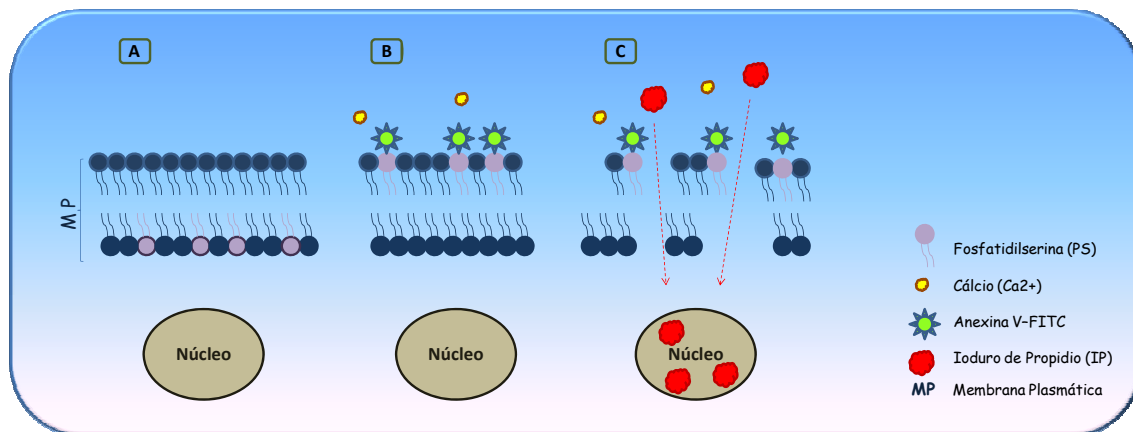
- ❖ Kit comercial *TansAM<sup>TM</sup> NFκB Chemi p65/p50/p52* de Active Motif (Catalogo N°. 40097 & 40597)

## *Procedimiento*

1. **Preparación de los reactivos:** Se prepararon según especifica el fabricante. El kit proporciona todos los reactivos que se menciona en los siguientes apartados y que son necesarios para el desarrollo del mismo.
2. **Unión del NF-kB a la secuencia consenso.** Se repartieron 30 µl de buffer completo de lisis en todos los pocillos. Después se añadieron, en los pocillos correspondientes a las muestras, 20 µl de muestra diluida en buffer completo de lisis, que contenían 2 µg de proteína. En los pocillos correspondientes al blanco se repartieron 20 µl de buffer completo de lisis, y en los pocillo controles se añadieron 1.25 µg de extractos nucleares de células Jurkat (también previstos por el kit) disueltos en 20 µl buffer completo de lisis como control positivo. Se cubrió la placa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Pasado este tiempo se lavó tres veces con 200 µl del buffer de lavado 1X.
3. **Unión del anticuerpo primario.** Se añadieron 50 µl del anticuerpo NF-kB, en una dilución 1:1000 en buffer de unión del anticuerpo 1X. Se cubrió la placa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y sin agitación. Pasado este tiempo se lavó 3 veces tal y como se describe en el paso anterior.
4. **Unión del anticuerpo secundario.** Se repartieron 50 µl del anticuerpo conjugado-HRP, en una dilución 1:1000 en buffer de unión del anticuerpo 1X. Se cubrió la placa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y sin agitación. Pasado este tiempo se lavó 4 veces tal y como se describe en el paso anterior.
5. **Detección por quimioluminiscencia.** Tras añadir 50 µl de solución de revelado a todos los pocillos, se eliminaron las burbujas y se realizó la medida de luminiscencia en un lector de placas Synergy HT BioTek (Winooski, VT, EE. UU.), de manera inmediata.

## Ensayo Apoptosis/Necrosis

Los ensayos de apoptosis/necrosis se llevaron a cabo mediante citometría de flujo, usando el kit *ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT* de immunostep, basado en la cuantificación, mediante citometría de flujo, de la unión de un conjugado de Anexina V-Isotiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC) a la fosfatidilserina (PS), expuesta en la cara externa de la membrana plasmática en células apoptóticas (Koopman et al. 1990). Esta exposición de la PS aparece como producto de la pérdida de asimetría en la bicapa lipídica en una etapa temprana de la apoptosis, permaneciendo la membrana plasmática aún intacta (Fadok et al. 1992). Mediante la tinción simultánea de Anexina V-FITC y un colorante no vital, el Ioduro de Propidio (IP), podemos discriminar entre células intactas (Anexina V-FITC negativo, IP negativo); apoptosis temprana (Anexina V-FITC positiva, IP negativa), donde la membrana ha perdido su asimetría pero permanece intacta y permite la exclusión del IP; y apoptosis tardía o células necróticas (Anexina V-FITC positiva, IP positivo), donde la membrana plasmática va perdiendo integridad y se expulsa menos IP que el que entra (Martin et al, 1996) (figura 16). En base a la intensidad de ambos colorantes se distinguirá entre apoptosis tardía o necrosis.



**Figura 16.** En esta figura se muestran tres etapas diferentes. A. Célula viva. La membrana plasmática mantiene su asimetría original, encontrándose la fosfatidilserina en la cara interna de la misma, con lo que la Anexina V-FITC no podrá acceder a ella; B. Apoptosis temprana. La exposición de la fosfatidilserina en la superficie externa de la membrana plasmática permite la unión, dependiente de Ca<sup>2+</sup>, de la Anexina V-FITC a la PS. En esta fase la membrana celular mantiene su integridad, por lo que puede excluir el IP; C. Apoptosis tardía. La membrana celular va perdiendo integridad y el IP tinte los ácidos nucleicos. La anexina V-FITC sigue unida a la PS, por lo que se obtendrá fluorescencia de ambos fluorocromos.

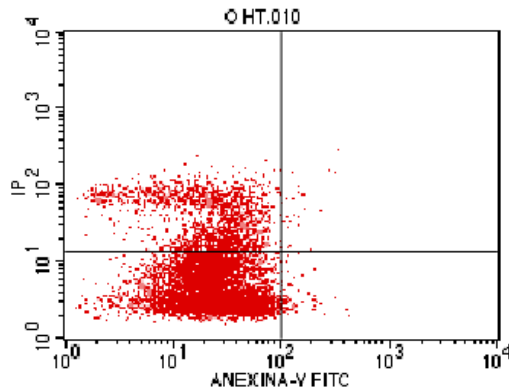
## ***Reactivos***

- ❖ PBS 1X
- ❖ Kit *ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT*, de immunostep (Catalog Ref: ANNEXINVKIT). El kit contiene:
  - Tampón de unión a la anexina
    - Hepes/NaOH 10 mM pH 7,4
    - NaCl 140 mM
    - CaCl<sub>2</sub> 25 mM.
  - Anexina V-FITC en una solución de BSA 1%, NaN<sub>3</sub> 0,09% pH 7,2
  - IP en PBS pH 7,4

## ***Procedimiento***

Se partió de una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Una vez lavadas las células con PBS, para eliminar los restos de medio de cultivo, se resuspendieron en tampón de unión a la Anexina. Se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l de la suspensión celular a las que se le añadieron 5  $\mu$ l de Anexina V-FITC y 5  $\mu$ l de IP, seguidamente se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Tras este periodo de incubación se le añadieron 400  $\mu$ l de tampón de unión a la Anexina, y se analizaron mediante citometría de flujo, a una longitud de onda de excitación de 488 nm para ambos fluorocromos, y recogiendo a una longitud de onda de emisión de 523 nm para la V-FITC y 585 nm para el IP. Para esta determinación se utilizó un Citómetro de flujo BECTON DICKINSON FACS Vantage CELL SORTER Láser COHERENT Enterprise 621 (488 nm. & 351-364 nm. (UV), que posee un láser Spectraphisic 630 nm. (Massachussets, USA) y está provisto del Software **CELL Quest Pro**.

Finalmente, se analizaron los porcentajes de células presentes en cada uno de los cuadrantes resultantes de la citometría, expresado como % Gated (figura 17).



**Figura 17.** Imagen obtenida tras el análisis mediante citometría de flujo. En el eje de las X tenemos la intensidad de la fluorescencia emitida por el fluorocromo FITC, unido a la anexina V. En el eje Y tenemos la intensidad de la fluorescencia roja emitida por el IP. Los puntos individuales representan células individuales y la idea es ver la densidad relativa de los puntos en cada cuadrante.

## Ensayo MTT

Este ensayo permite evaluar la viabilidad celular mediante la metabolización de un compuesto cuyo producto resultante es medible colorimétricamente (Mosmann 1983). Al incubar las células con bromuro 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), este reactivo es captado mediante endocitosis y reducido mediante la acción de una deshidrogenasa mitocondrial (Slater et al., 1963) que lo transforma en un producto denominado sal de formazán. Esta sal es un compuesto cromogénico, de color púrpura insoluble en medio acuoso, pero soluble en dimetilsulfoxido (DMSO). El anillo de tetrazolium es roto únicamente dentro de mitocondrias activas, con lo que esta metabolización solo es posible en células vivas. La sal, acumulada en los lisosomas, es transportada a la superficie celular mediante el proceso de exocitosis. La generación de estos cristales coloreados puede ser medida espectrofotométricamente en un lector de placas (Madesh et al., 1997).

La determinación de esta técnica de MTT tras 24 h de incubación de las células con ceruleína, nos indica la citotoxicidad que provoca esta sustancia en las células.

## Reactivos

- ❖ DMSO (Sigma ref. D5879)

- ❖ MTT (Sigma ref. M5655)
- ❖ Medio RPMI sin rojo fenol (Sigma)

### ***Procedimiento***

Se partió de una cantidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se dejaron unos pocillos sin células, para poder determinar posteriormente el blanco correspondiente al DMSO. Tras una centrifugación a  $200 \times g$  durante 5 min en una centrifuga especial para placas, se eliminó el medio de cultivo volcando la placa rápidamente. Se añadieron 30  $\mu$ l de una solución de MTT (preparada en medio RPMI sin rojo fenol a una concentración de 2,143 mg/ml) a cada pocillo excepto a los que no tenían células, y se incubó la placa en un incubador de células a 37°C en una atmósfera con un 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire durante 4 h. De esta manera las células viables metabolizaron el compuesto y produjeron la sal formazán, mientras que las no viables no pudieron metabolizarlo. Pasado este tiempo de incubación se centrifugó la placa a  $1100 \times g$  durante 15 min y se volcó rápidamente, y con cuidado, el sobrenadante con el MTT que no se había transformado. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ l de DMSO a todos los pocillos, incluidos los que no tenían células. Se agitó la placa durante un minuto aproximadamente, a velocidad intermedia, y se midió la absorbancia en un lector de placas a 570 nm y a 690 nm, esta última para restar el background de la placa. Para esta determinación se utilizó un lector de placas de multidetección, modelo Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc.). Los datos se registraron usando el software Gen5™ de Bio Tek.

Los resultados de viabilidad se expresaron como porcentaje de densidad óptica con respecto a los grupos no modificados, considerando que estos últimos poseen un 100% de viabilidad.

### **Material Empleado**

- ✓ Agitador 3D Boeco mini-shaker (Hamburgo, Alemania).

- ✓ Agitador de placas Boeco (Hamburgo, Alemania).
- ✓ Agitador de tubos vortex Heidolph Reax Top (Schwabach, Alemania).
- ✓ Agitador magnético Selecta Agimatic-N (Barcelona, España).
- ✓ Agitador mecánico a varilla Heidolph RZR1 (Schwabach, Alemania).
- ✓ Analizador de imágenes de Quimioluminiscencia y Fluorescencia de Alta Sensibilidad LAS-4000 Mini FUJI-FILM mediante el software Image-Reader LAS-4000.
- ✓ Balanza de precisión Precisa 125A (Dietikon, Suiza).
- ✓ Baño de agua termostatzado con agitador Memmert WB-14 (Schwabach, Alemania).
- ✓ Baño de agua termostatzado con agitador Selecta Unitronic-Or (Barcelona, España).
- ✓ Campana de flujo laminar Thermo Scientific Heraeus Laminair HVR 2436 (Waltham, MA, EE. UU.).
- ✓ Cápsula de aluminio con septum goma/PTFE, 11 mm (Scharlab).
- ✓ Centrífuga CS-6R Beckman (Brea, CA, EE.UU.).
- ✓ Centrífuga de placas 5804 R/rotor A-2-DWP Eppendorf (Madrid, España).
- ✓ Centrífuga mikro 20 Hettich/rotor angular 24 plazas (Tuttlingen, Alemania).
- ✓ Centrífuga universal 32SR/rotor oscilante 4 plazas (28 tubos) Hettich (Tuttlingen, Alemania).
- ✓ Citómetro de flujo FACS Vantage Cell sorter Becton Dickinson (Massachusetts, USA). Unidad de Citometría de Flujo, Servicio de Biología Fundamental. Fuente Nueva. CIC-UGR.
- ✓ Congelador vertical -80 °C Thermo Scientific Revco (Waltham, MA, EE. UU.)
- ✓ Cromatógrafo de gases 7673 A Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA).



- ✓ Densitómetro De Imágenes Scion Image, Frederick, MD, USA.
- ✓ Dispensador de botella Boeco (Hamburgo, Alemania).
- ✓ Dispensador manual tipo “combitips” Boeco (Hamburgo, Alemania).
- ✓ Equipo de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad).
- ✓ Equipo de transferencia Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad)
- ✓ Fuente de alimentación (cód. 164-5050 Bio-Rad)
- ✓ Homogeneizador de tejido Potter-Elvehjem con pistilo de teflón® (Wheaton).
- ✓ Incubador células Thermo Forma® Direct Heat CO<sub>2</sub> Incubator (Waltham, MA, EE. UU.).
- ✓ Insertos 0,3 ml (National Scientific).
- ✓ Lector de placas Synergy HT BioTek (Winooski, VT, EE. UU.).
- ✓ Liofilizador. Unidad de Análisis de Alimentos. Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM). CIC-UGR.
- ✓ Microscopio de contraste de fases Olympus CK2 (Hamburgo, Alemania).
- ✓ pHmetro Hanna pH 210 (Eibar, España).
- ✓ Pipetas automáticas Boeco (Hamburgo, Alemania).
- ✓ Pipetas automáticas Eppendorf Research®plus (Madrid, España).
- ✓ Pipetas monocanal digital Eppendorf Research®pro (Madrid, España).
- ✓ Pipetas multicanal digital Eppendorf Research®pro (Madrid, España).
- ✓ Pipeteador electrónico Boeco (Hamburgo, Alemania).
- ✓ Sonicador baño Branson Ultrasonic Bench Cleaner 200 (Dietzenbach, Alemania).
- ✓ Ultracentrífuga L8-70M/rotor 70.1 TI Beckman (Brea, CA, EE.UU.).
- ✓ Vial de vidrio, 1,8 ml (Kimble).

## Tratamiento Estadístico de los resultados

Salvo que se diga expresamente lo contrario, los resultados presentados en el texto, tablas y figuras son valores medios y sus errores estándar ( $\bar{X} \pm \text{EEM}$ ).

En primer lugar se realizó 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.

Para las variables sin distribución normal, se utilizaron los test no paramétricos U de Mann-Whitney y H de Kruskal-Wallis.

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 experimentales mediante un ANOVA de una vía (procedimiento one-way de SPSS), seguido del test a posteriori (*post-hoc*) de Diferencias Mínimas Significativas (DMS), cuando la variable independiente tenía más de 2 categorías, y mediante la prueba t de Student en el caso de 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 realizaron 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 (versión 15.0).



# **R**ESULTADOS



## RESULTADOS

### Determinación del Perfil Lipídico de membrana en células AR42J diferenciadas

La concentración relativa de los ácidos grasos individuales de las membranas de las células AR42J diferenciadas de los grupos NM, MO y Mn-3 se detallan en la tabla 13. Los ácidos grasos mayoritarios de las membranas de las células del grupo NM fueron: ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1 n-9 cis), y ácido esteárico (C18:0), en su conjunto representaron un 70,15% de los ácidos grasos totales. El contenido de ácido linoleico (C18:3 n-3), ácido araquidónico (C20:4 n-6), ácido palmitoleico (C16:1 n-9), ácido mirístico (C14:0), ácido linoleico (C18:2 n-6 cis), y ácido araquídico (C20:0) fue de 2% a 4%. Entre los ácidos grasos minoritarios (<2%) se incluyen de forma decreciente, los ácidos grasos: DHA (C22:6 n-3), ácido eicosatrienoico (C20:3 n-6), ácido behénico (C22:0), ácido lignocérico (C24:0), ácido nervónico (C24:1 n-9), EPA (C20:5 n-3), y ácido láurico (C12:0).

En los grupos MO y Mn-3 se observó que las membranas de las células AR42J se enriquecieron significativamente de acuerdo al ácido graso específico añadido al medio de cultivo (C18:1 n-9; C20:5 n-3 y C22:6 n-3). El grupo MO, respecto al grupo NM, incrementó su contenido en C18:1 n-9 en 1,3 veces, mientras que el grupo Mn-3 aumentó su contenido en C20:5 n-3 y C22:6 n-3 en 7,5 y 3,8 veces respectivamente, respecto al grupo NM. Por otro lado, en los grupos MO y Mn-3 hubo un aumento de otros ácidos grasos. En el grupo MO se observa un aumento de ácido mirístico (C14:0) y linolénico (C18:3 n-3) de 1,3 veces, y en el grupo de Mn-3 un aumento de ácido laurico (C12:0) y nervónico (C24:1 n-9) de 3,1 y 1,5 veces, respectivamente. El ácido palmítico (C16:0) y el ácido oleico (C18:1 n-9) son el SFA y el MUFA más abundante en los tres grupos, mientras que los PUFA que se encuentran en mayor concentración son el ácido linolénico (C18:3 n-3) en los grupos NM y MO, y DHA (C22:6 n-3) en el grupo Mn-3. Como un control adicional también se determinaron las concentraciones relativas de los ácidos grasos del suero bovino fetal estándar (SCF), enriquecido en C18:1 n-9 (SCF-O), y enriquecido en PUFA n-3 (SCF-n3), los resultados se muestran en la tabla 14.

Ácidos grasos	NM	MO	Mn-3
<b>C12:0</b>	0,46 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,14 <sup>b</sup>
<b>C14:0</b>	3,4 ± 0,20 <sup>a</sup>	4,58 ± 0,08 <sup>b</sup>	3,39 ± 0,10 <sup>a</sup>
<b>C16:0</b>	28,05 ± 0,21 <sup>a</sup>	27,39 ± 0,10 <sup>a</sup>	24,99 ± 0,29 <sup>b</sup>
<b>C16:1 n-9</b>	3,47 ± 0,20 <sup>a</sup>	3,85 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,47 ± 0,08 <sup>b</sup>
<b>C18:0</b>	16,41 ± 0,26 <sup>a</sup>	12,35 ± 0,33 <sup>b</sup>	18,30 ± 0,62 <sup>c</sup>
<b>C18:1 n-9</b>	25,69 ± 0,41 <sup>a</sup>	32,40 ± 1,11 <sup>b</sup>	19,84 ± 0,53 <sup>c</sup>
<b>C18:2 n-6</b>	3,33 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,89 ± 0,15 <sup>c</sup>
<b>C18:3 n-3</b>	3,83 ± 0,20 <sup>a</sup>	5,11 ± 0,36 <sup>b</sup>	2,66 ± 0,25 <sup>c</sup>
<b>C20:0</b>	2,29 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,94 ± 0,32 <sup>ab</sup>	1,48 ± 0,12 <sup>b</sup>
<b>C20:3 n-6</b>	1,44 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,11 <sup>b</sup>	0,96 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>C20:4 n-6</b>	3,80 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,11 <sup>b</sup>	3,21 ± 0,26 <sup>c</sup>
<b>C20:5 n-3</b>	0,58 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,37 ± 0,36 <sup>b</sup>
<b>C22:0</b>	1,32 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,04 <sup>a</sup>
<b>C22:5 n-6</b>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,19 <sup>b</sup>
<b>C22:6 n-3</b>	1,87 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,06 <sup>b</sup>	7,08 ± 0,11 <sup>c</sup>
<b>C24:0</b>	1,19 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,46 ± 0,03 <sup>c</sup>
<b>C24:1 n-9</b>	0,85 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,27 ± 0,11 <sup>c</sup>

**Tabla 13.** Concentración relativa de ácidos grasos en las membranas de células acinares pancreáticas AR42J, incubadas durante 72h en medio estándar (NM), o en medio enriquecido en C18:1 n-9 (MO), o en PUFAs n-3 (Mn-3), en presencia de DX (100 nM). Los resultados están expresados como porcentaje del contenido total de ácidos grasos. Los valores representan la media ± EEM (n=10-22) proveniente de al menos tres lotes diferentes de células. Las letras a, b y c indican diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos.

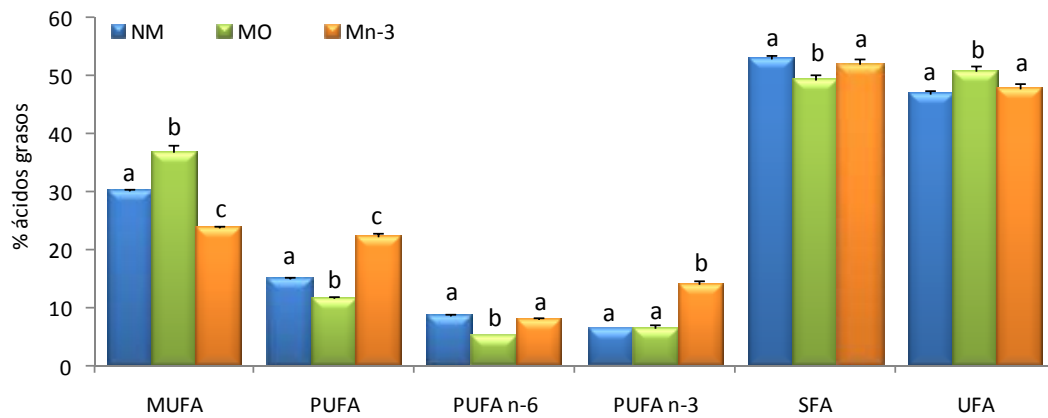
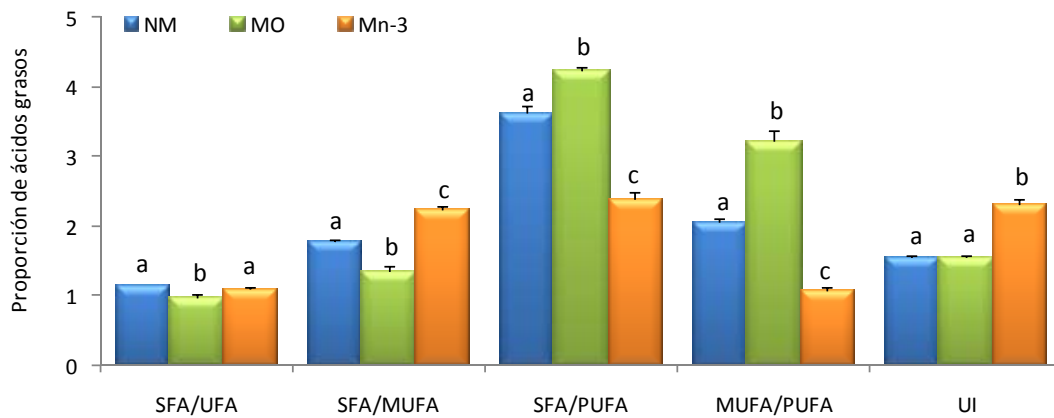
Ácidos grasos	SCF	SCF-O	SCF-n3
C8:0	17,35	14,72	12,64
C10:0	0,33	0,68	0,45
C12:0	0,00	0,50	1,05
C14:0	6,73	1,03	1,78
C15:0	0,39	0,40	0,51
C16:0	21,31	12,87	14,69
C16:1 n-9	2,33	2,81	4,15
C17:0	0,80	0,28	0,57
C18:0	12,52	7,69	10,42
C18:1 n-9 trans	0,33	1,96	5,44
C18:1 n-9 cis	15,57	<b>40,92</b>	16,26
C18:2 n-6	5,36	4,32	5,62
C18:3 n-3	0,00	0,55	0,67
C20:0	0,00	0,00	0,22
C20:1 n-9	0,00	0,10	0,20
C20:3 n-3	0,00	0,00	0,07
C20:3 n-6	0,41	2,16	1,66
C20:4 n-6	3,35	3,75	2,00
C20:5 n-3	1,05	0,43	<b>7,78</b>
C22:0	6,30	0,70	0,86
C22:2 n-6	0,45	0,22	3,11
C22:5 n-6	1,54	1,40	0,69
C22:6 n-3	2,04	1,65	<b>8,55</b>
C24:0	0,78	0,13	0,04
C24:1 n-9	1,03	0,74	0,59

**Tabla 14.** Concentración relativa de los ácidos grasos presentes en el suero bovino fetal que se le añadió al medio de cultivo donde se incubaron las células acinares pancreáticas AR42J. SCF, suero bovino fetal estándar; SCF-O, suero bovino fetal enriquecido en C18:1 n-9; SCF-n3, suero bovino fetal enriquecido en PUFAs n-3. Los resultados están expresados como porcentaje del contenido total de ácidos grasos. Los valores representan la media (n=3-4).

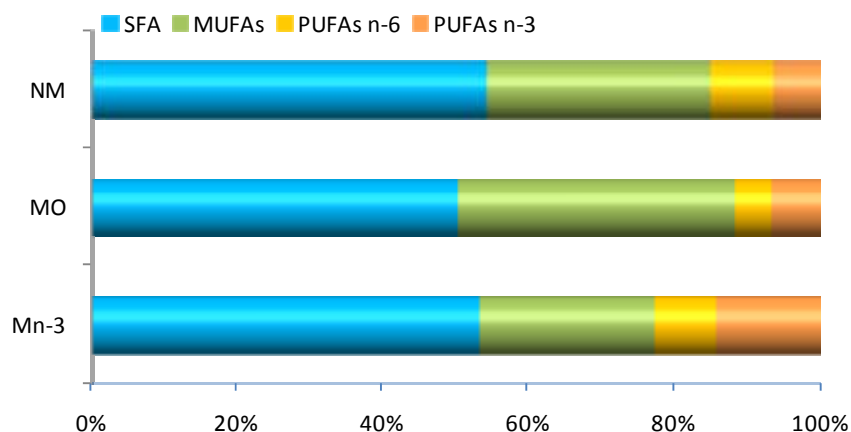


La Figura 18 A muestra el perfil de ácidos grasos de las membranas de los grupos NM, MO y Mn-3. Comparando los tres grupos, la adición de C18:1 n-9 (grupo MO) al medio de cultivo produce un aumento significativo del contenido de AGMI (36,9%). Mientras que la adición de C20:5 n-3 y de C22:6 n-3 (grupo Mn-3) produce un aumento significativo del total de PUFA (22,17%), debido principalmente al aumento de los PUFA n-3 (14,1%). En cuanto al contenido de PUFA n-6, de los grupos NM y Mn-3 no se encontraron diferencias significativas entre ellos, sin embargo, la cantidad de PUFA n-6 del grupo MO (5,05%) fue significativamente menor que los grupos NM y Mn-3. A pesar de ello, el grupo MO, debido al aumento de la concentración relativa de C18:1 n-9 en la membrana, mostró la mayor cantidad de UFA totales. Por otro lado, el contenido de SFA en el grupo MO fue significativamente menor que en los grupos NM y Mn-3. La adición de C18:1 n-9 al medio de cultivo (grupo MO), produjo un aumento de la cantidad de PUFA a expensas de una disminución de PUFA n-6 y de SFA, mientras que la adición de C20:5 n-3 y C22:6 n-3 (grupo Mn-3) produjeron un aumento de la cantidad de PUFA n-3 a expensas de una disminución de MUFA (figura 19).

Respecto a los índices de los ácidos grasos, el grupo MO mostró una mayor proporción de MUFA/PUFA y de SFA/PUFA que los demás grupos, a su vez, el grupo Mn-3 presentó una mayor proporción del índice SFA/MUFA, respecto a los otros dos grupos, y junto al grupo NM un mayor valor para el índice SFA/UFA. En relación al índice de insaturación (UI), el grupo Mn-3 mostró un mayor UI que los grupos NM y MO (figura 18 B).

**A****B**

**Figura 18. A.** Perfil de ácidos grasos de membranas de células AR42J incubadas durante 72h en medio estándar (NM), o en medio enriquecido en 18:1 n-9 (MO), o en PUFA n-3 (Mn-3) en presencia de DX (100 nM). MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; SFA, ácidos grasos saturados; UI, ácidos grasos insaturados. Los resultados están expresados como porcentaje del contenido total de ácidos grasos. **B.** Índice de ácidos grasos. UI, índice de insaturación. Los valores representan la media  $\pm$  EEM (n=10-22) proveniente de al menos tres lotes diferentes de células. Las letras a, b y c indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos.



**Figura 19.** Porcentaje de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), ácidos grasos poliinsaturados n-6 (PUFAs n-6) y ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFAs n-3), presentes en las membranas de las células AR42J diferenciadas con dexametasona (100 nM), con membranas no modificadas (NM), modificadas en oleico (MO) y modificadas en PUFAs n-3 (Mn-3).

## Respuesta Inflamatoria

### *Activación del NFκB*

La activación del NFκB se analizó, por un lado mediante la concentración citosólica de la proteína IκBα, haciendo uso de la técnica Western blot (figura 20 A), y por otro lado a través de los niveles nucleares de la subunidad p65 del NFκB, mediante el kit comercial TransAM™ de Active Motif, en cada uno de los grupos experimentales.

Con el fin de corroborar una significativa correlación negativa entre ambos parámetros, se realizó dicho estudio (figura 24) en cada uno de los grupos estudiados, expresados todos ellos, como factor respecto a los grupos de membrana referencia, siendo por tanto NM, MO y Mn-3 = 1.

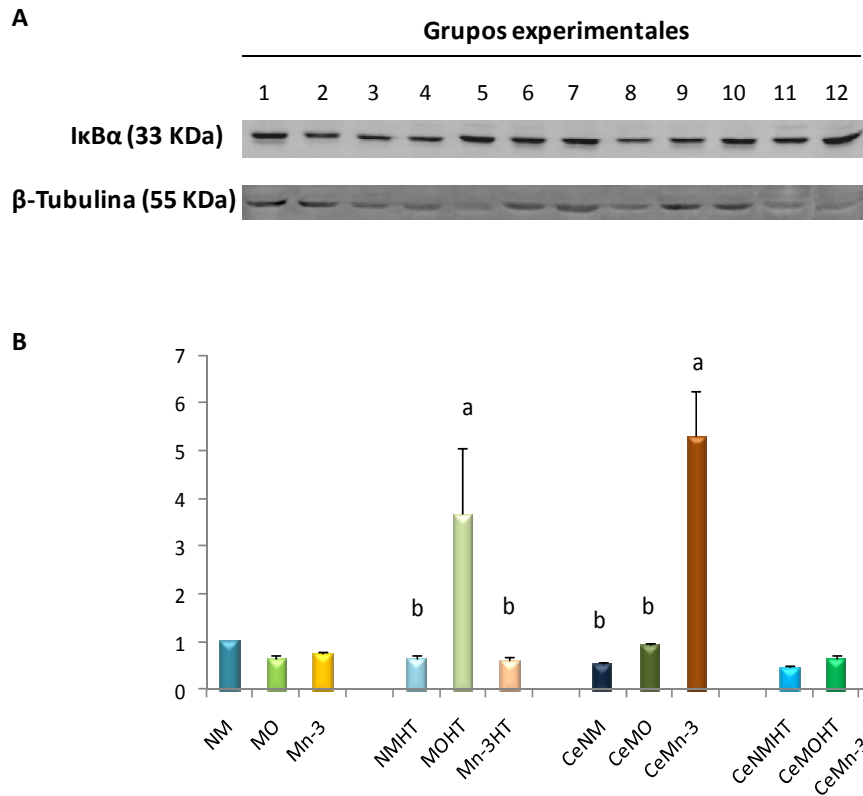
### *IκBα*

En principio, si observamos el efecto que puede tener la modificación de la membrana plasmática ante un mismo tratamiento (figura 20 B), vemos que las concentraciones citosólicas de IκBα en los grupos de membrana NM, MO y Mn-3, son similares, no

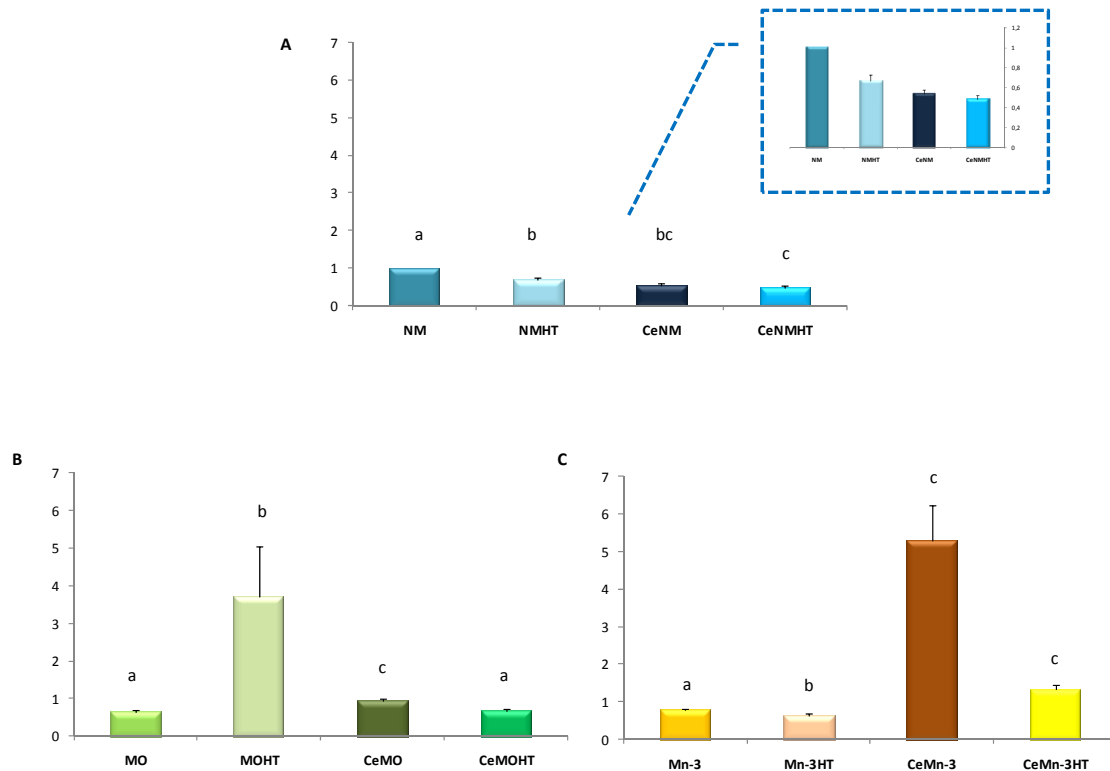
existiendo diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, el grupo MOHT presenta una mayor concentración citosólica de esta proteína que los grupos NMHT y Mn-3HT, de un modo significativo ( $P < 0.05$ ). Con respecto al tratamiento con ceruleína, los grupos CeNM y CeMO tienen concentraciones similares, mientras que el grupo CeMn-3 muestra una concentración significativamente mayor ( $P < 0.05$ ). Por último, los grupos CeNMHT, CeMOHT y CeMn-3HT contienen niveles similares de dicha proteína en el citosol.

Dentro de las células con membranas sin modificar (figura 21 A), el grupo NMHT, al igual que el grupo CeNM, presentan concentración citosólica de  $I\kappa B\alpha$ , significativamente menores ( $P < 0.05$ ), al grupo NM. Por otra parte, aunque los grupos NMHT y CeNMHT exhiben diferencias significativas, mostrando una menor concentración este último, los niveles de esta proteína entre los grupo CeNM y CeNMHT son similares.

En relación a las células con membranas modificadas en oleico (figura 21 B), el grupo MOHT, al igual que CeMO, contienen concentraciones significativamente mayores al grupo MO. Sin embargo, el grupo CeMOHT presenta una concentración significativamente menor a los grupos NMHT y CeMO, y similar al grupo MO. Aunque tanto el grupo MOHT como CeMO son significativamente mayores al grupo MO, el grupo CeMO contiene una menor concentración citosólica de  $I\kappa B\alpha$  que la detectada en el grupo MOHT, de una forma significativa ( $P < 0.05$ ).



**Figura 20.** Concentración citosólica de la proteína IκBα. **A.** Cada banda corresponde a un grupo experimental, así la banda 1 corresponde al grupo NM, la banda 2 al MO, la banda 3 es el grupo Mn-3, la banda 4 NMHT, la banda 5 MOHT, la banda 6 Mn-3HT, la banda 7 CeNM, la banda 8 CeMO, la banda 9 CeMn-3, la banda 10 CeNMHT, la banda 11 CeMOHT, y por último, la banda 12 es el grupo CeMn-3HT. **B.** Concentración citosólica de IκBα expresada como factor respecto al grupo NM, siendo este 1, en valores medios  $\pm$  EEM. Letras diferentes expresan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Las comparaciones estadísticas en esta figura están enfocadas a ver las diferencias entre grupos de membranas para un mismo tratamiento.  $N = 3$  en todos los grupos.

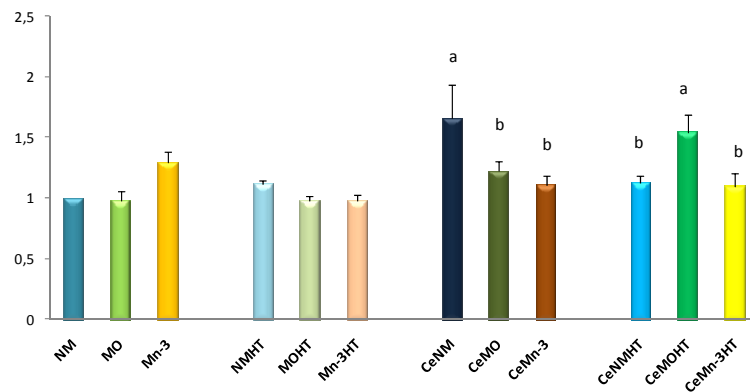


**Figura 21. A.** Concentraciones citosólicas de I $\kappa$ B $\alpha$  en los grupos de células con membranas sin modificar, expresadas como veces de aumento respecto al grupo NM. **B.** Concentraciones citosólicas de I $\kappa$ B $\alpha$  en los grupos de células con membranas modificadas en oleico, expresadas como factor respecto al grupo MO. **B.** Concentraciones citosólicas de I $\kappa$ B $\alpha$  en los grupos de células con membranas modificadas en PUFA n-3, expresadas como factor respecto al grupo Mn-3. Los valores que se expresan como valores medios  $\pm$  EEM. Letras diferentes expresan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). N = 3 en todos los grupos.

En la figura 21 C, se observa que el grupo CeMn-3 presenta mayor concentración de I $\kappa$ B $\alpha$  que el grupo Mn-3, mientras que en el grupo Mn-3HT se ha detectado menor cantidad de esta proteína que en Mn-3. Entre los grupos CeMn-3 y CeMn-3 no existen diferencias significativas, mientras que entre Mn-3HT y CeMn-3 HT sí, siendo dicha concentración mayor, en este último grupo.

*p65*

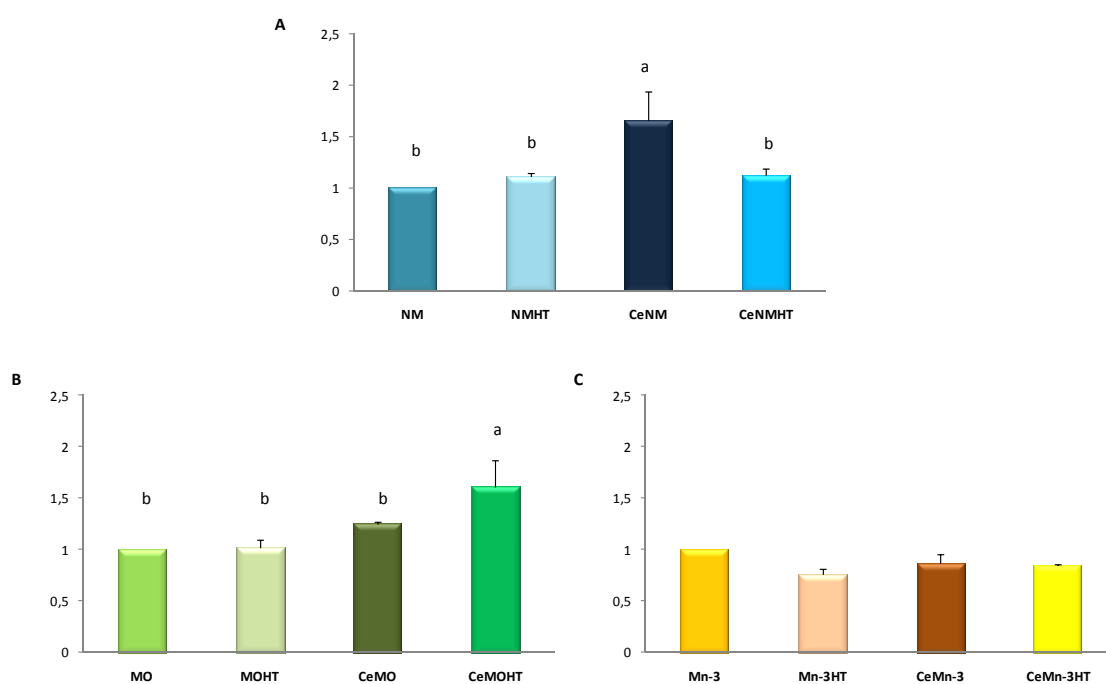
Con respecto a los niveles nucleares de la subunidad p65 detectados en cada uno de los grupos de membranas ante un mismo tratamiento (figura 22), se observa que el grupo CeNM presenta cantidad significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) de dicha subunidad, dentro del núcleo, que los grupos CeMO y CeMn-3. En el caso de un tratamiento conjunto con ceruleína y HT, es el grupo CeMOHT el que muestra una mayor concentración nuclear de dicha proteína, significativamente, con respecto a los grupos CeNMHT y CeMn-3HT.



**Figura 22.** Niveles nucleares de p65 expresada como factor respecto al grupo NM, en valores medios  $\pm$  EEM. Letras diferentes expresan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Las comparaciones estadísticas en esta figura están enfocadas a ver las diferencias entre grupos de membranas para un mismo tratamiento.  $N = 3$  en todos los grupos.

Referente a las células con membranas sin modificar (figura 23 A), es el grupo CeNM el que presenta niveles nucleares de p65 significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) al resto de los grupos, mientras que los grupos NM, NMHT y CeNMHT muestran niveles similares.

En el caso de las células con membranas modificadas en oleico (figura 23 B), se ha detectado niveles similares en todos los grupos excepto en el grupo CeMOHT, el cual presenta una cantidad significativamente mayor a todos ellos ( $P < 0.05$ ).



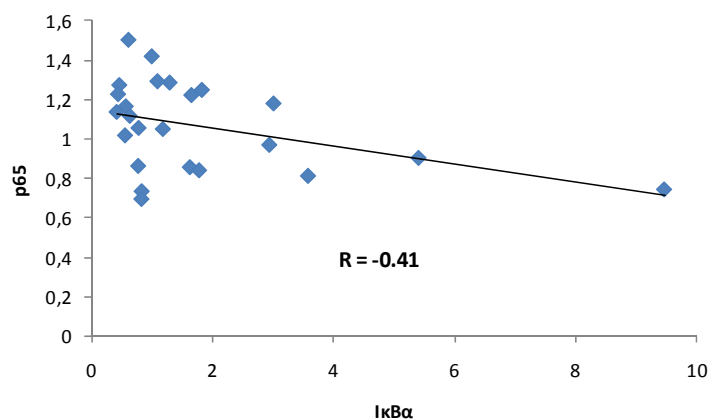
**Figura 23. A.** Niveles nucleares de p65 en los grupos de células con membranas sin modificar, expresadas como factor respecto al grupo NM. **B.** Niveles nucleares de p65 en los grupos de células con membranas modificadas en oleico, expresadas como factor respecto al grupo MO. **C.** Niveles nucleares de p65 en los grupos de células con membranas modificadas en PUFA n-3, expresadas como factor respecto al grupo Mn-3. Los valores que se expresan como valores medios  $\pm$  EEM. Letras diferentes expresan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).  $N = 3$  en todos los grupos.



En todos los grupos de células modificadas con PUFAs n-3 (figura 23 C) se observan niveles nucleares de p65 similares. No se han detectado diferencias significativas entre ellos.

### *Correlación IκBα-p65*

Con respecto a la correlación entre los parámetros analizados anteriormente, se ha observado una significativa correlación negativa ( $P < 0.05$ ) entre las concentraciones citosólicas de IκBα y los niveles nucleares de la subunidad p65 del NFκB (figura 24) en los grupos estudiados.



**Figura 24.** Correlación entre la concentración citosólica de la proteína IκBα y los niveles nucleares de p65. Son valores absolutos expresados como factores respecto a los grupos referencia (NM, MO y Mn-3 = 1).

## ***Producción de mediadores inflamatorios (IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ )***

La secreción de IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  en las células AR42J se determinó a través del análisis de los sobrenadantes del cultivo celular mediante el Kit MILLIPLEX<sup>TM</sup><sub>MAP</sub> R4T CYTOQUINE/CHEMOKINE 96 Well Plate Assay de Millipore, basado en la Tecnología Luminex® xMAP® de Corporation.

Con los resultados obtenidos se calculó la relación IL-10/IL-6 con el fin de observar el balance entre citocinas anti y pro-inflamatorias en cada uno de los grupos, siendo un valor indicativo del status inflamatorio de la célula.

En el caso del TNF $\alpha$ , las concentraciones en el medio fueron tan bajas que, a pesar de tratarse de una técnica muy sensible, no se pudieron cuantificar. También se destacan los bajos niveles de IL-1 $\beta$  en todos los grupos experimentales, que aunque estos sí se pudieron determinar, muestran los valores más pequeños en relación al resto de citocinas.

En la tabla 15 se muestran las concentraciones, de cada uno de los mediadores inflamatorios estudiados, presentes en el medio donde se incubaron los grupos de células AR42J, cuyas membranas no se modificaron con ningún ácido graso. En esta tabla se observa que el grupo CeNM presenta mayor cantidad de IL-6, significativamente ( $P < 0.05$ ), respecto al grupo NM. Sin embargo el grupo CeNMHT muestra valores similares de esta citocina que el grupo NM. Respecto a las IL-10 y la IL-1 $\beta$ , no se detectan diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, en la relación IL-10/IL-6, se aprecia una ligera disminución ( $P = 0.089$ ) en el grupo CeNM respecto a NM.

	NM	NMHT	CeNM	CeNMHT
<b>IL-10</b>	6,95 ± 1,90	7,03 ± 1,72	5,99 ± 1,37	7,44 ± 1,69
<b>IL-1beta</b>	0,68 ± 0,12	0,64 ± 0,10	0,63 ± 0,09	0,64 ± 0,10
<b>IL-6</b>	4,95 ± 1,07 <sup>b</sup>	4,40 ± 0,99 <sup>b</sup>	8,88±2,03 <sup>a</sup>	5,26 ± 1,50 <sup>b</sup>
<b>IL-10/IL-6</b>	2,05 ± 0,83	1,60 ± 0,32	0,81±0,17	1,97 ± 0,60

**Tabla 15.** Concentración de citocinas (pg/ml) halladas en el medio de cultivo de los grupos experimentales de células AR42J con membranas sin modificar. La determinación se efectuó tras finalizar las últimas 26 horas de tratamiento. Los valores están expresados como media ± EEM. N=7-10. Letras diferentes expresan diferencias significativas (P<0,05).

En el caso de células AR42J con membranas modificadas en oleico (tabla 16) se aprecia que el grupo MOHT revela una disminución, significativa, en la secreción de IL-10 y IL-1 $\beta$  respecto al grupo MO, mientras que la secreción de IL-6 es similar en ambos grupos. Además, el índice IL-10/IL-6 es significativamente menor en el grupo MOHT en relación a MO. Entre los grupo MO y CeMO no existen diferencias significativas para ningunos de los mediadores inflamatorios analizados. Entre los grupos CeMO y CeMOHT, este último presenta una secreción de IL-1 $\beta$  significativamente menor, y una tendencia (P=0.089) a disminuir la secreción de IL-6, mientras que el resto de mediadores muestran valores similares. Si observamos los grupos MOHT y CeMOHT, se destaca un valor significativamente mayor del índice IL-10/IL-6, en el grupo CeMOHT.

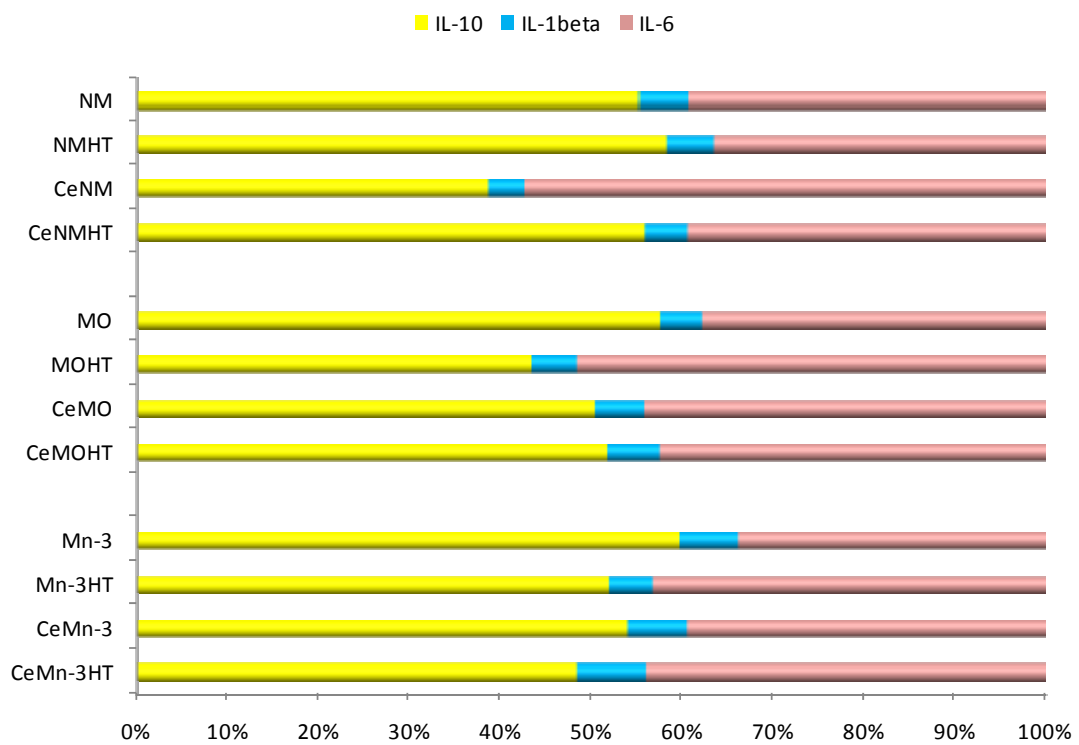
	MO	MOHT	CeMO	CeMOHT
<b>IL-10</b>	8,21 ± 1,90 <sup>a</sup>	3,01 ± 0,95 <sup>b</sup>	7,71 ± 1,95 <sup>ab</sup>	4,40 ± 1,36 <sup>ab</sup>
<b>IL-1beta</b>	0,67 ± 0,11 <sup>ac</sup>	0,34 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,82 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,07 <sup>bc</sup>
<b>IL-6</b>	5,40 ± 1,01	3,58 ± 0,78	6,78 ± 1,77	3,62 ± 1,41
<b>IL-10/IL-6</b>	1,83 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,25 <sup>b</sup>	2,16 ± 0,46 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,63 <sup>a</sup>

**Tabla 16.** Concentración de citocinas (pg/ml) halladas en el medio de cultivo de los grupos experimentales de células AR42J con membranas modificadas en ácido oleico. La determinación se efectuó tras finalizar las últimas 26 horas de tratamiento. Los valores están expresados como media ± EEM. N=7-10. Letras diferentes expresan diferencias significativas (P<0,05).

	Mn-3	Mn-3HT	CeMn-3	CeMn-3HT
<b>IL-10</b>	6,07 ± 1,19	5,23 ± 1,06	5,57 ± 1,24	3,94 ± 1,31
<b>IL-1beta</b>	0,65 ± 0,12	0,47 ± 0,10	0,66 ± 0,08	0,61 ± 0,12
<b>IL-6</b>	3,45 ± 0,71	4,36 ± 1,70	4,07 ± 0,53	3,59 ± 1,00
<b>IL-10/IL-6</b>	1,71 ± 0,35	1,87 ± 0,42	1,65 ± 0,28	1,43 ± 0,46

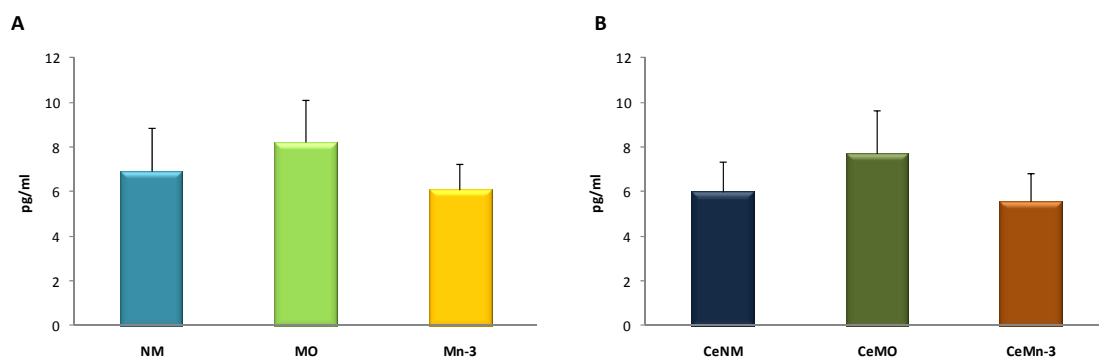
**Tabla 17.** Concentración de citocinas (pg/ml) halladas en el medio de cultivo de los grupos experimentales de células AR42J con membranas modificadas en omega-3. La determinación se efectuó tras finalizar las últimas 26 horas de tratamiento. Los valores están expresados como media ± EEM. N=7-10. Letras diferentes expresan diferencias significativas (P<0,05).

En la tabla 17 se representan los valores obtenidos, de cada uno de los intermediarios, en los grupos de células AR42J cuyas membranas han sido adaptadas a PUFAs n-3. No se han detectado diferencias ni en las concentraciones de IL-10, IL-6 y IL-1 $\beta$  ni en el índice IL-10/IL-6, entre los diferentes grupos experimentales.

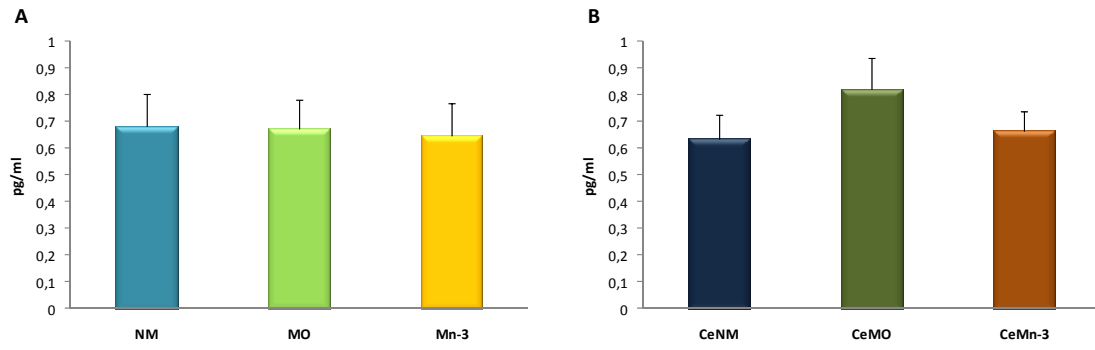


**Figura 25.** Representación porcentual de citocinas halladas en el medio de cultivo de cada grupo experimental. IL-10 barra de color amarillo; IL-1 $\beta$  barra de color azul; IL-6 barra de color rosa. La determinación se efectuó tras finalizar las últimas 26 horas de tratamiento.

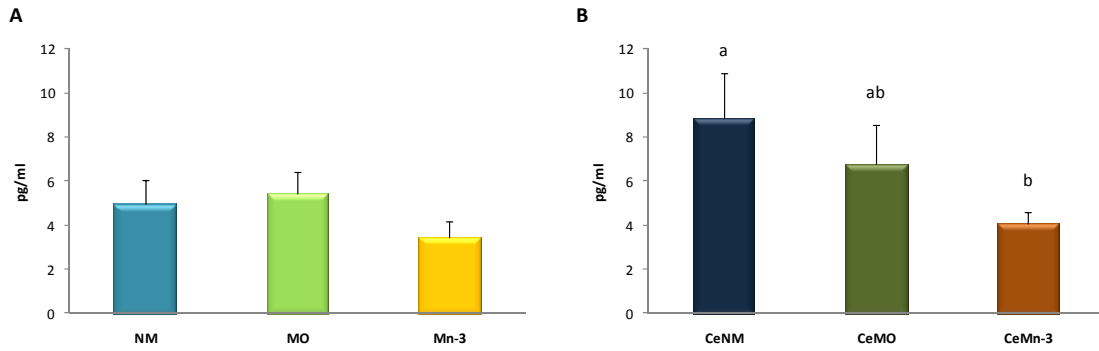
Respecto al posible efecto que pueda tener la modificación de la membrana *per se* en la secreción de citocinas, no se han detectado diferencias significativas entre los grupos NM, MO y Mn-3 ni en la secreción de IL-10 (figura 26 A), ni de IL-1 $\beta$  (figura 27 A), ni de IL-6 (figura 28 A). Sin embargo, sí que se han observado diferencias significativas en la secreción de dichas citocinas ante la estimulación con ceruleína 10<sup>-8</sup>M. Así pues, mientras que no se advierten diferencias entre los grupos CeNM, CeMO y CeMn-3 en relación a la concentración de IL-10 (figura 26 B) y IL-1 $\beta$  (figura 27 B), sí muestran diferentes patrones en cuanto a la secreción de IL-6 y la relación IL-10/IL-6. De modo que el grupo CeMn-3 exhibió una concentración de IL-6 significativamente menor al grupo CeNM (figura 28 B). Sin embargo, es el grupo CeMO el que presentan una relación IL-10/IL-6 mayor al grupo CeNM, de un modo significativo ( $P > 0.05$ ) (figura 29 B).



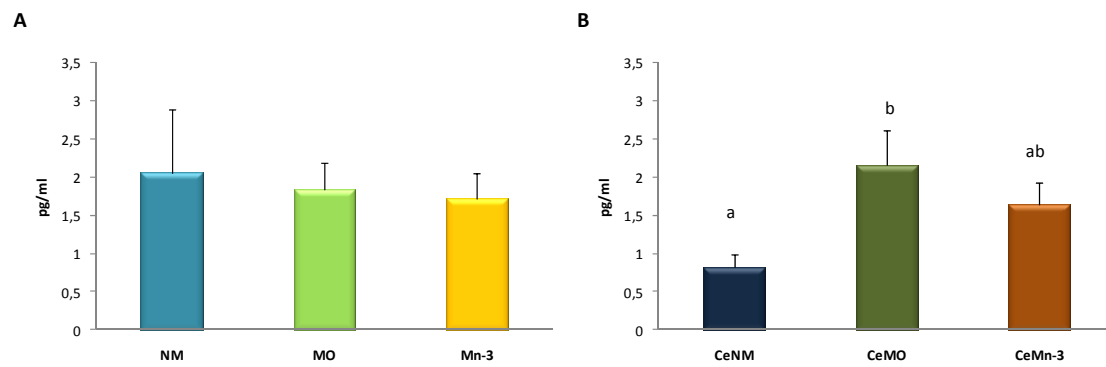
**Figura 26.** Concentración (pg/ml) de IL-10 hallada en el medio de cultivo de células AR42J con membranas no modificadas, modificadas en ácido oleico y en omega-3, incubadas en ausencia (A) o en presencia de ceruleína 10<sup>-8</sup> M (B). Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM. N=7-10. Letras diferentes expresan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 27.** Concentración (pg/ml) de IL-1 $\beta$  hallada en el medio de cultivo de células AR42J con membranas no modificadas, modificadas en ácido oleico y en omega-3, incubadas en ausencia (A) o en presencia de ceruleina 10<sup>-8</sup> M (B). Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM. N=7-10. Letras diferentes expresan diferencias significativas (P<0,05).



**Figura 28.** Concentración (pg/ml) de IL-6 hallada en el medio de cultivo de células AR42J con membranas no modificadas, modificadas en ácido oleico y en omega-3, incubadas en ausencia (A) o en presencia de ceruleina 10<sup>-8</sup> M (B). Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM. N=7-10. Letras diferentes expresan diferencias significativas (P<0,05).



**Figura 29.** Relación IL-10/IL-6 existente en células AR42J con membranas no modificadas, modificadas en ácido oleico y en omega-3, incubadas en ausencia (A) o en presencia de ceruleína  $10^{-8}$  M (B). Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM. N=7-10. Letras diferentes expresan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Mecanismos de Muerte Celular

### *Ensayo apoptosis/necrosis mediante Citometría de Flujo*

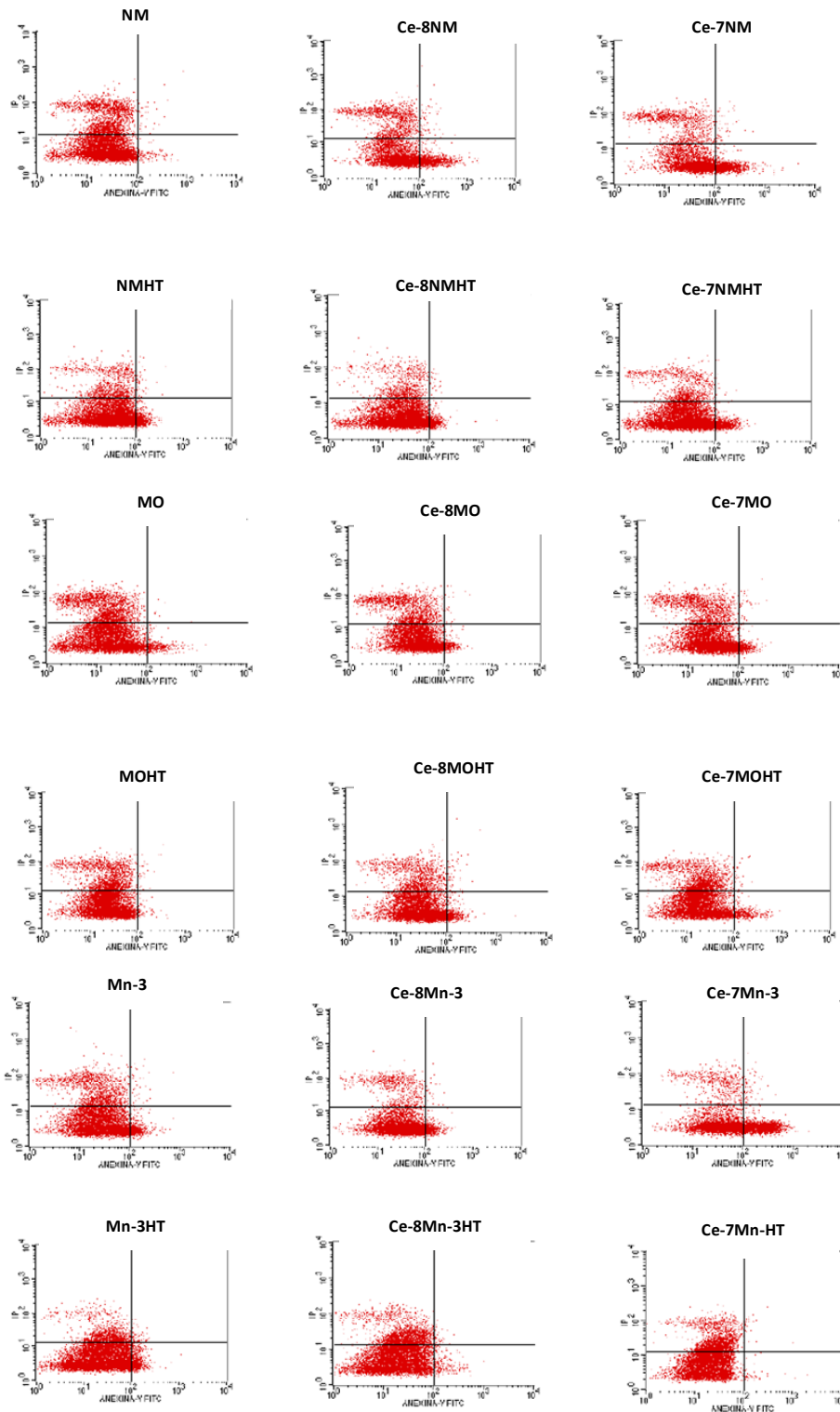
Con el fin de conocer el efecto de los componentes nutricionales sobre los mecanismos de muerte celular que se inducen durante la pancreatitis aguda, se realizó, en todos los grupos experimentales, un ensayo de apoptosis/necrosis mediante citometría de flujo. Este ensayo, a través de la tinción simultánea de Anexina V-FITC y un colorante no vital, el Ioduro de Propidio (IP), permite discriminar entre células intactas (Anexina V-FITC negativo, IP negativo); apoptosis temprana (Anexina V-FITC positiva, IP negativa) ya que la bicapa lipídica ha perdido su asimetría pero la membrana permanece intacta y no puede entrar el IP; y apoptosis tardía o células necróticas (Anexina V-FITC positiva, IP positivo), donde la membrana plasmática ya no está intacta.

Una de las ventajas de la citometría de flujo es que permite evaluar individualmente cada célula (no sólo el promedio), y además el análisis de un número estadísticamente significativo de células (desde 1000 a más de 100.000 células).

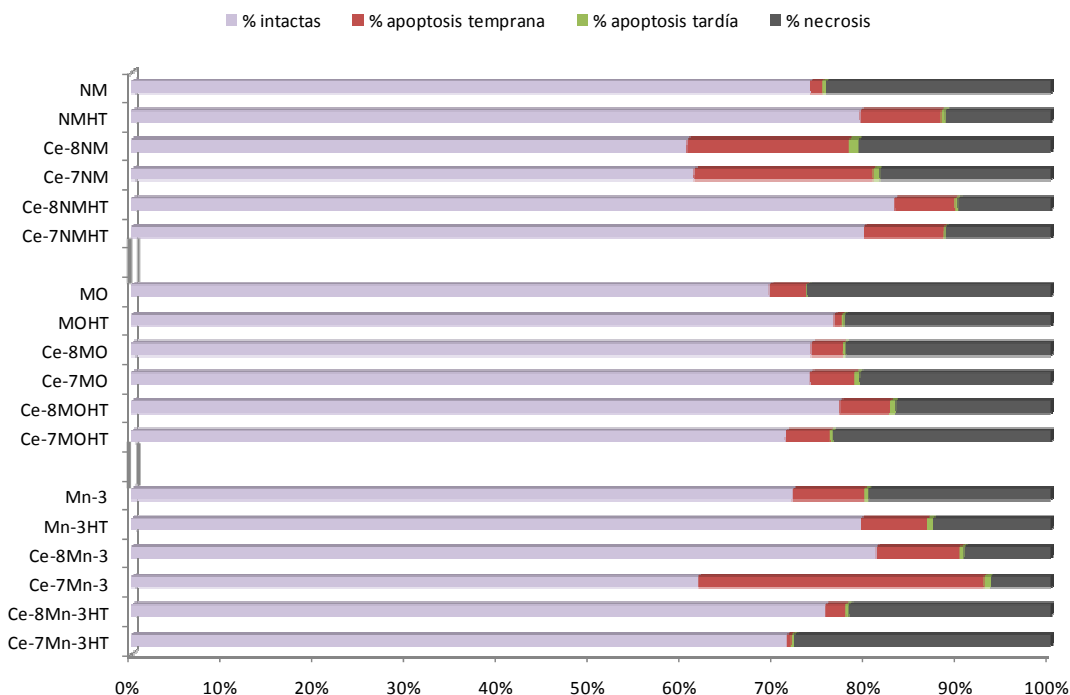
Este ensayo se ha llevado a cabo en todos los grupos experimentales, incluidos los grupos tratados con ceruleína  $10^{-7}$  M. Se analizaron los porcentajes de células presentes en cada uno de los cuadrantes resultantes de la citometría, lo cual se expresa como % Gated (figura 30)



En la figura 31 se muestran conjuntamente los porcentajes referentes a células intactas, células en apoptosis temprana, en apoptosis tardía y células necróticas para cada grupo experimental. En esta grafica se observa que los niveles de apoptosis tardía (barra color verde) en todos los grupos es muy pequeña. De hecho, ninguno mostró valores mayores al 1%. Es por este motivo por el que en este trabajo se considera la apoptosis como la suma de apoptosis temprana y tardía. Y a partir de estos resultados se ha calculado la relación apoptosis/necrosis en cada grupo experimental.



**Figura 30.** Imágenes obtenidas tras el análisis mediante citometría de flujo en cada uno de los grupos experimentales. En el eje de las X se muestra la intensidad de la fluorescencia emitida por el fluorocromo FITC, unido a la anexina V. En el eje Y tenemos la intensidad de la fluorescencia roja emitida por el IP. Los puntos individuales representan células individuales y la idea es ver la densidad relativa de los puntos en cada cuadrante (%Gated). Cada diagrama está dividido en cuatro cuadrantes, las células que aparecen en el cuadrante inferior izquierda corresponden a células vivas; las del cuadrante inferior derecha son células en apoptosis temprana; en el cuadrante superior derecha se muestran las células en apoptosis tardía; y finalmente, en el cuadrante superior izquierda las células en necrosis. N=10000 células en cada grupo.



**Figura 31.** Representación conjunta del porcentaje de células intactas, células en apoptosis temprana, en apoptosis tardía y células necróticas en cada uno de los grupos experimentales. La barra color violeta corresponde al porcentaje de células intactas; la de color morado al porcentaje de apoptosis temprana; color verde apoptosis tardía; y la barra negra es el porcentaje de células necróticas.

A continuación se detalla cada parámetro de forma individual con el fin de describir los resultados minuciosamente.

### *Células intactas*

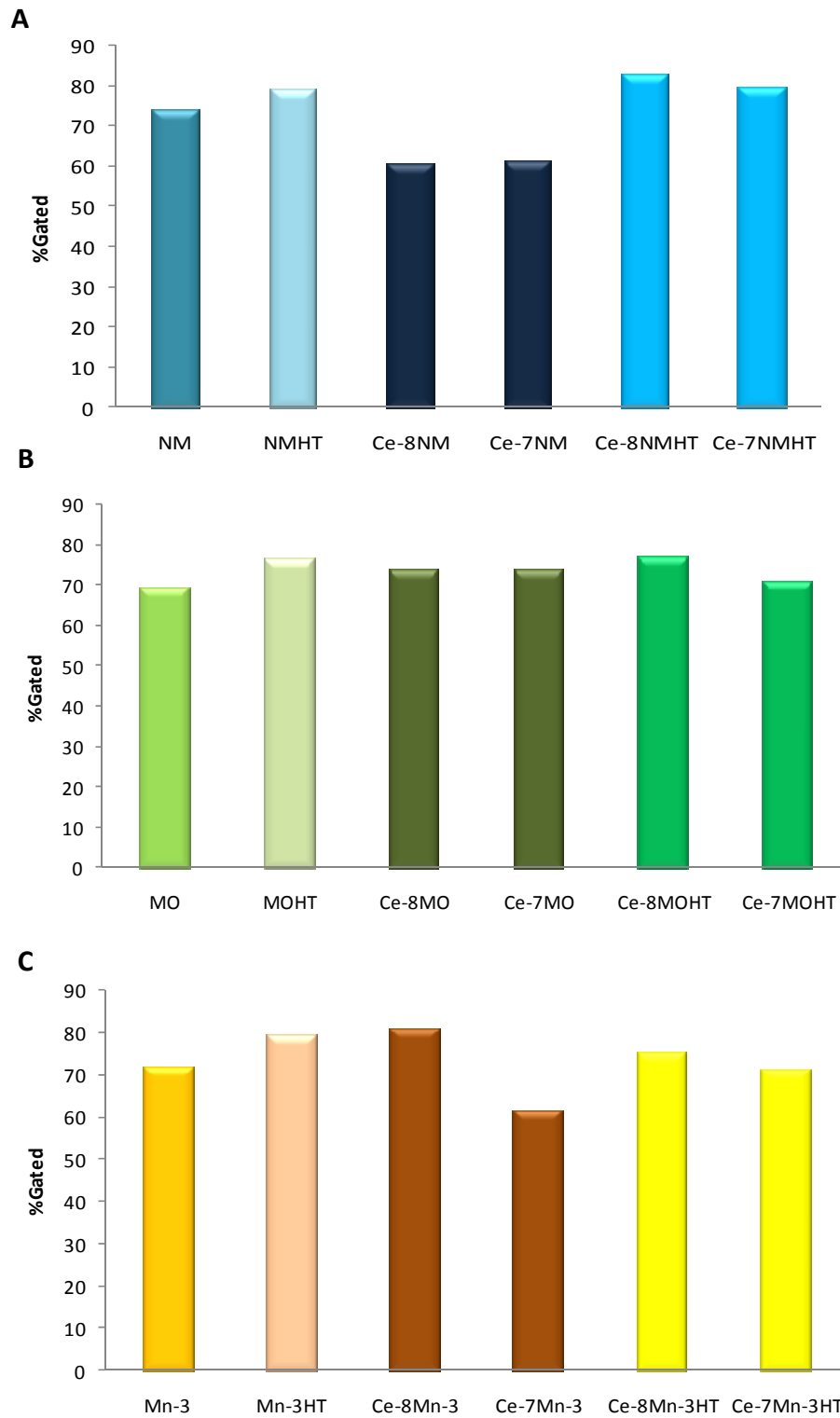
En la figura 32 se representa el porcentaje de células intactas presentes en cada uno de los grupos experimentales. Esta figura está dividida en tres gráficas, A, B y C. La gráfica A indica el número de células intactas encontrado en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J con membranas no modificadas. En la gráfica B se muestran las pertenecientes a los grupos de células con membranas modificadas en oleico. Y en la C. se representan los resultados correspondientes a este parámetro en los grupos de células con membranas modificadas en ácido grasos poliinsaturados omega-3 (PUFAs n-3). Este patrón de presentación será el mismo en el resto de variables estudiadas en este apartado.

En la figura 32 A se observa que las células AR42J no modificadas, cuando se incuban 24 horas con ceruleína  $10^{-8}$  M o  $10^{-7}$  M, que son los grupos Ce-8NM y Ce-7NM, presentan un menor porcentaje de células intactas. Sin embargo cuando esta ceruleína se le añade tras 2 h de incubación previa con HT y en presencia de éste durante las 24 h siguientes, grupos Ce-8NMHT y Ce-7NMHT, presentan más células intactas incluso que el grupo sin tratar, grupo NM. De esta figura se destaca el hecho de que el grupo NMHT tenga mayor número de células intactas que el grupo NM. Este aumento se observa también en los grupos MOHT y Mn-3HT con respecto MO y Mn-3 respectivamente (figura 32 B y C).

En la figura 32 B. se observa que los grupos tratados con ceruleína, Ce-8MO y Ce-7MO, muestran valores similares al grupo MO. Los porcentajes son del 73.9% en el grupo Ce-8MO, 73.8% en el grupo Ce-7MO, frente al 69.4% del grupo MO. En general estas células parecen bastantes estables con respecto al número de células vivas presentes en cada uno de los tratamientos aplicados ya que muestran todas valores similares. De hecho, las variaciones que se aprecian en esta gráfica entre los diferentes grupos experimentales son muy suaves.

Entre los diferentes grupos de células AR42J modificadas con PUFAs n-3, figura 32 C, se observa que el grupo Ce-8Mn-3, no varía el porcentaje de células intactas con respecto Mn-3, mientras que el grupo Ce-7Mn-3, si que presentan menor cantidad de células intactas que Mn-3.

Al compara el porcentaje de células intactas en los grupos sin tratar, NM, MO y Mn-3, (figura 31 A, B y C) se observa que los tres cuentan con un porcentaje similar (73.8, 69.4 y 72 % respectivamente).



**Figura 32.** Porcentaje de células presentes en el cuadrante de la citometría correspondiente a células intactas, expresado como % gated intactas. **A.** % gated intactas en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J no modificadas, NM. **B.** % gated intactas en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J enriquecidas en ácido oleico, MO. **C.** % gated intactas en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J enriquecidas en PUFAs n-3, Mn-3

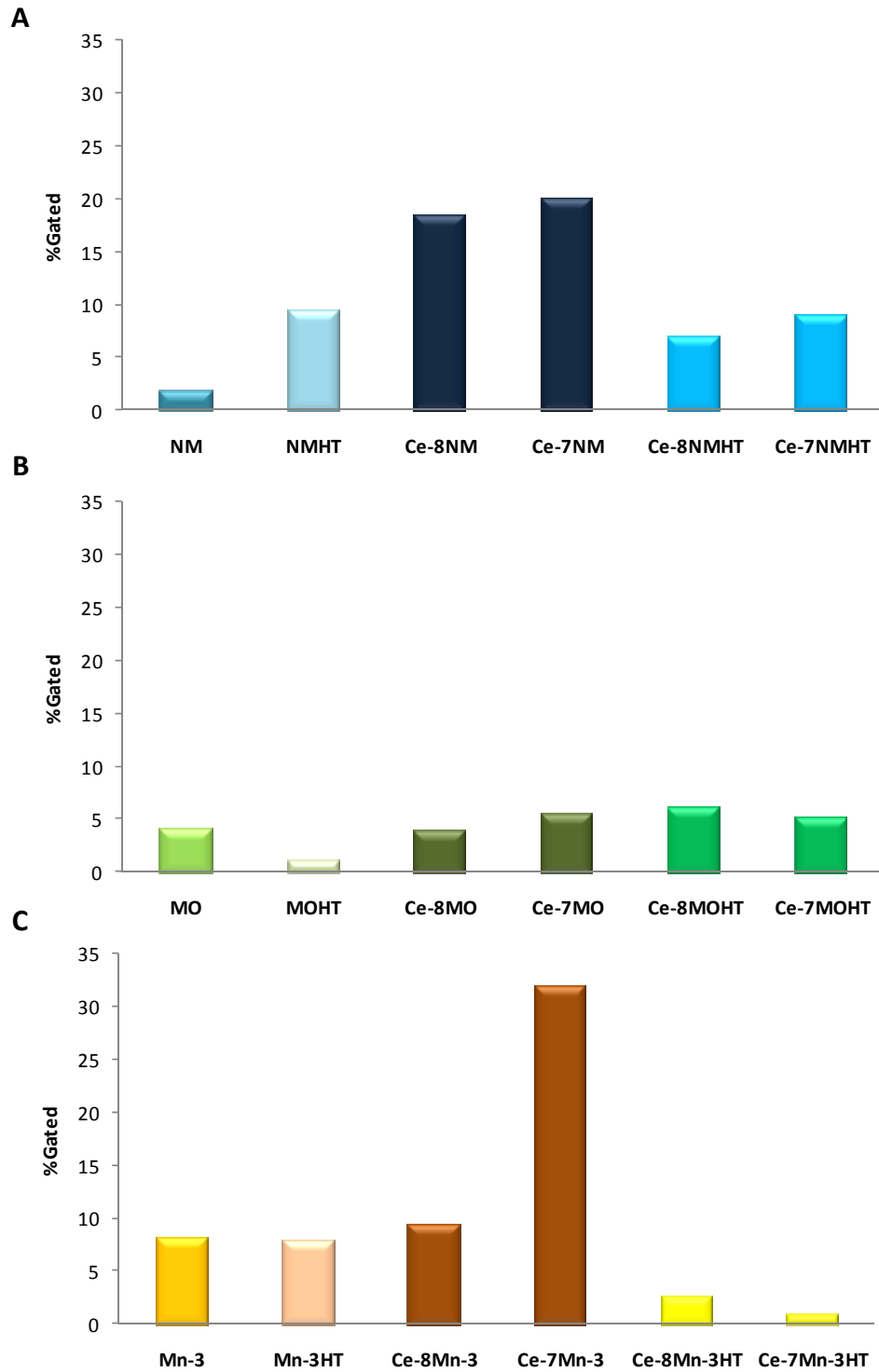
### *Apoptosis*

La figura 33 representa el porcentaje de células apoptóticas presentes en cada uno de los grupos experimentales. Esta figura está dividida en tres gráficas, A, B y C. En la gráfica A se muestran los grupos pertenecientes a células AR42J con membranas no modificadas. En la gráfica B los grupos con membranas modificadas en oleico. Y en la C. se representan los resultados correspondientes los grupos de células con membranas modificadas en PUFAs n-3.

En la grafica 33 A., se observa que el grupo NMHT presenta más células en apoptosis que el grupo NM. Por otra parte, son los grupos Ce-8NM y Ce-7NM los que muestran mayor número de células en apoptosis, en concreto el grupo Ce-7NM. Sin embargo, en los grupos Ce-8NMHT y Ce-7NMHT, esta apoptosis es menor con respecto a la encontrada en los grupos Ce-8NM y Ce-7NM, mostrando valores incluso menores al grupo NMHT (NMHT 9.4%; Ce-8NMHT 6.9%; Ce-7NMHT 8.98%). Esta disminución en los grupos Ce-8NMHT y Ce-7NMHT, se efectúa manteniendo las diferencias existentes entre ambas dosis de ceruleína, siendo por tanto, el porcentaje de células apoptóticas menor en el grupo Ce-8NMHT.

Como se muestra en la figura 33 B., el tratamiento con HT en células AR42J modificadas con oleico, grupo MOHT, produce una disminución en el porcentaje de células en apoptosis, siendo este porcentaje el menor entre todos los grupos oleico. El grupo Ce-8MO muestra un porcentaje de apoptosis similar al grupo MO (3,87 y 4,03% respectivamente). Sin embargo, el porcentaje del grupo Ce-7MO es ligeramente mayor a estos (5,37%). Aunque como ocurría con las células intactas, el grupo de células oleico presenta una gran estabilidad ante los diferentes tratamientos, excepto, en este caso, el grupo MOHT.

Entre los grupos de células AR42J modificadas en PUFAs n-3, figura 33 C., se destaca el gran aumento en el porcentaje de células apoptóticas que presenta el grupo Ce-7Mn-3 en relación al resto de tratamientos. A diferencia de lo ocurrido en las células no modificadas (figura 33 A.) y en las enriquecidas en oleico (figura 33 B.), el tratamiento con HT en células enriquecidas en omega-3 no varía la apoptosis, alcanzando el grupo Mn-3HT valores similares a su grupo sin tratar, Mn-3 (figura 33 C.). Del mismo modo que ocurría en el grupo de células no modificadas, los grupos Ce-8Mn-3HT y Ce-7Mn-3HT presentan valores menores que los grupos Ce-8Mn-8 y Ce-7Mn-3. Esta diferencia es mucho más fuerte entre el grupo Ce-7Mn y Ce-7MnHT.



**Figura 33.** Suma del porcentaje de células presentes en el cuadrante de la citometría correspondiente a células en apoptosis temprana más las pertenecientes al cuadrante de células en apoptosis tardía, lo cual se expresa como % gated en apoptosis. **A.** % gated en apoptosis, en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J no enriquecidas en ácidos grasos, NM. **B.** % gated en apoptosis, en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J enriquecidas en ácido oleico, MO. **C.** % gated en apoptosis, en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J enriquecidas en PUFAs n-3, Mn-3.

Cabe destacar que es el grupo Ce-7Mn-3 (figura 33 C.) el que presenta mayor porcentaje de células apoptóticas, un 31,85%, comparado con un 20,12% en el grupo Ce-7NM (figura 33 A.), y un 5,37% en el grupo Ce-7MO (figura 33 B.). Sin embargo, el grupo Ce-7Mn-3HT presenta el menor porcentaje de apoptosis, un 0,86%, frente a un 8,98% del grupo Ce-7NMHT, y un 5,15% del grupo Ce-7MOHT (figuras 33 C., A. y B respectivamente)

### *Necrosis*

La figura 34 muestra el porcentaje de células necróticas presentes en cada uno de los grupos experimentales. Esta figura está dividida en tres gráficas, A, B y C. En la gráfica A se muestran los grupos pertenecientes a células AR42J con membranas no modificadas. En la gráfica B los grupos con membranas modificadas en oleico. Y en la C. se representan los resultados correspondientes los grupos de células con membranas modificadas en PUFAs n-3.

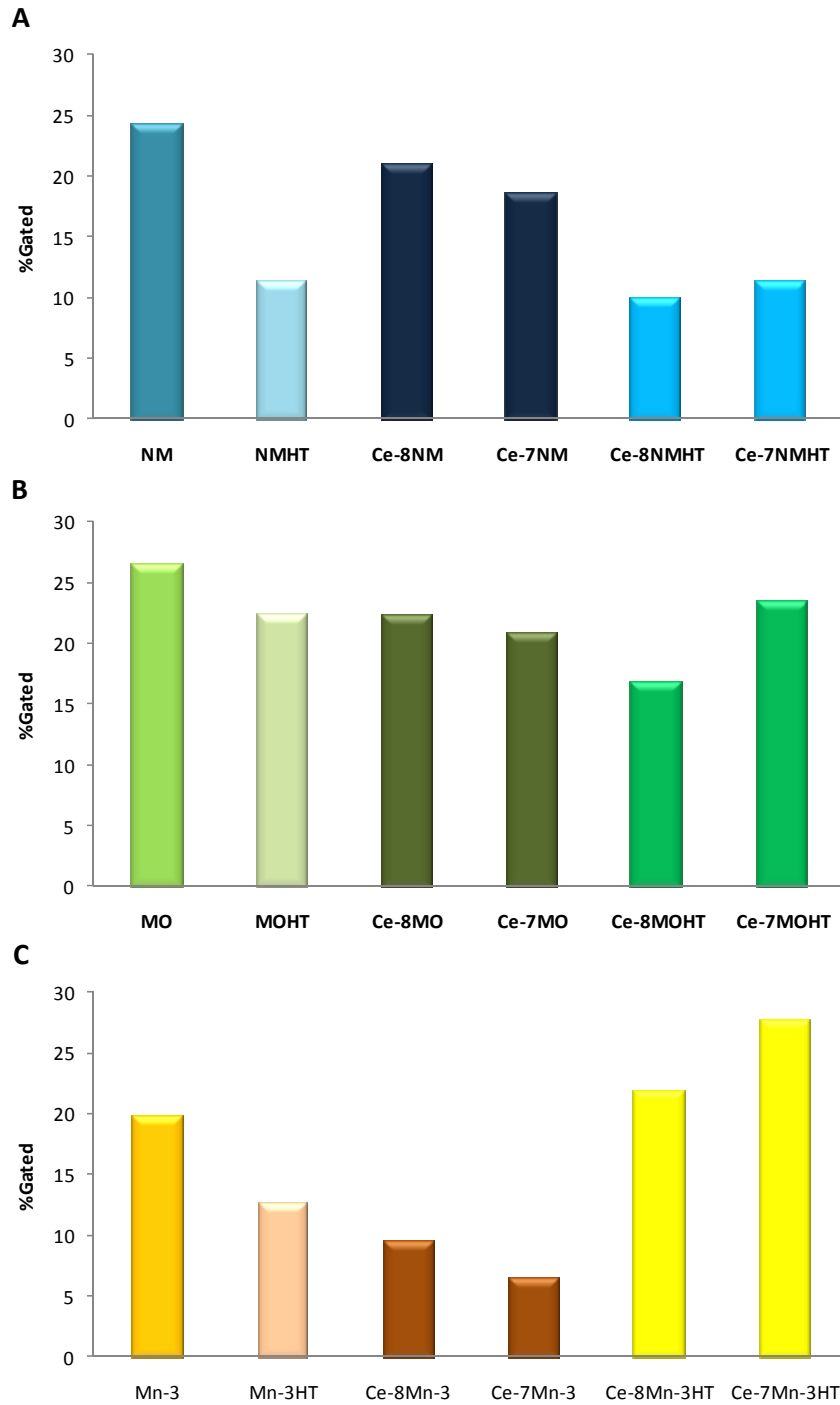
En la figura 34 A observamos que tanto el grupo Ce-8NM como Ce-7NM tienen un porcentaje de células necroticas menor al grupo NM, siendo este número mucho menor en los grupos Ce-8NMHT y Ce-7NMHT. Los grupos Ce-8NMHT y Ce-7NMHT muestran valores similares al presente en el grupo NMHT (10.0, 11.4 y 11.40% respectivamente).

En el caso de las células con membranas enriquecidas en oleico, figura 34 B, los grupos MOHT, Ce-8MO, Ce-7MO y Ce-7MOHT presentan valores de necrosis similares (22.36, 22.24, 20.84 y 23.62% respectivamente). Sin embargo, el grupo Ce-8MOHT es el que presenta un porcentaje bastante menor, 16.81%.

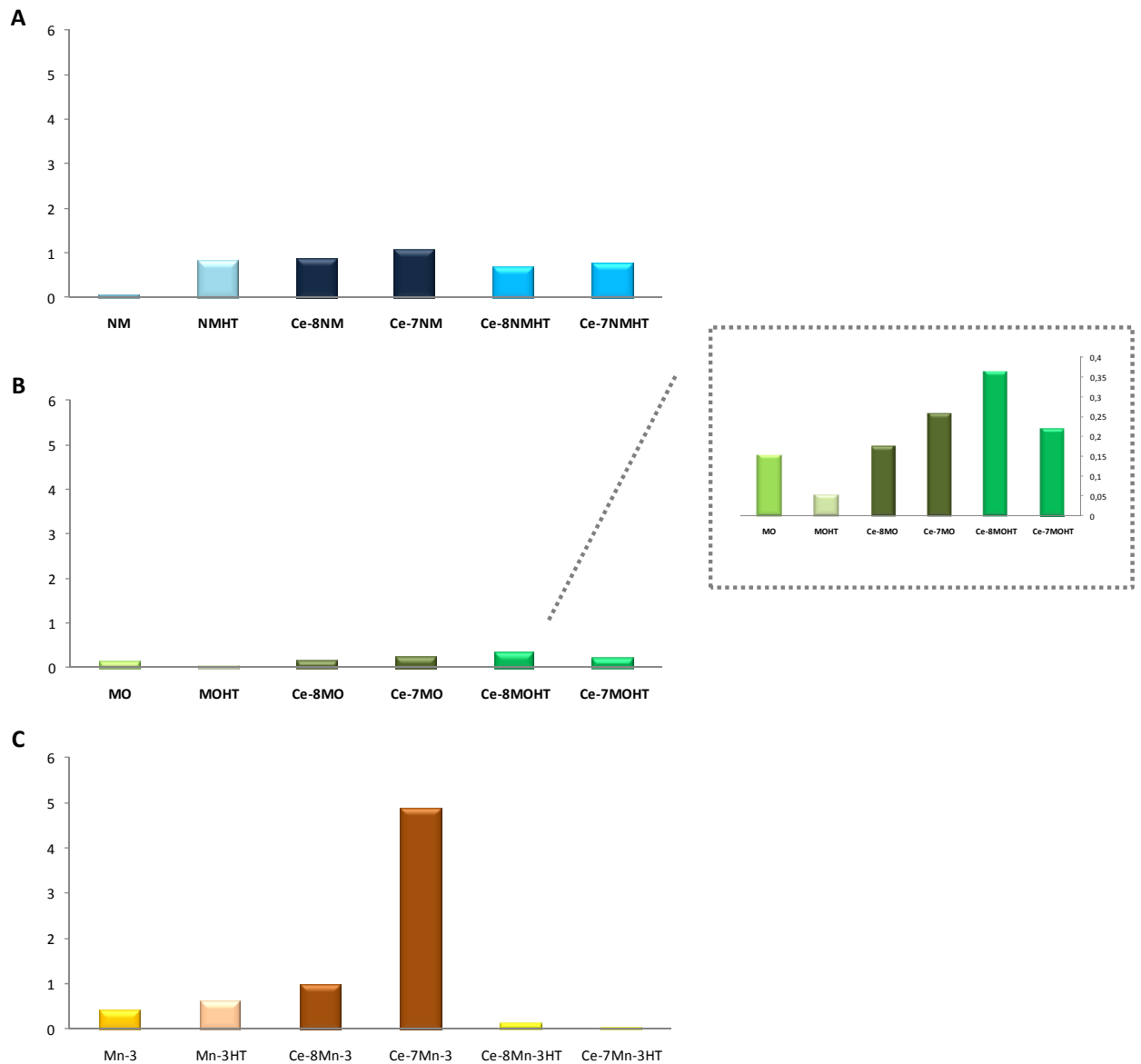
La figura 34 C los grupos Mn-3HT, Ce-8Mn-3 y Ce-7Mn-3 presentan un porcentaje de necrosis menor con respecto a las no tratadas, grupo Mn-3. Sin embargo los grupos Ce-8Mn-3HT y Ce-7Mn-3HT, tienen más necrosis incluso que el grupo Mn-3 (Ce-7Mn-3HT con un 27.79% frente al 19.25%).

El grupo Mn-3 presenta menor necrosis que los grupos NM y MO. Por último, destacar que la disminución en necrosis en los grupos NMHT y Mn-3HT, se relacionan con un aumento en células intactas (figura 31).





**Figura 34.** Porcentaje de células presentes en el cuadrante de la citometría correspondiente a células en necrosis, lo cual se expresa como % gated en necrosis. **A.** % gated en necrosis en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J no enriquecidas en ácidos grasos, NM. **B.** % gated en necrosis en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J enriquecidas en ácido oleico, MO. **C.** % gated necrosis en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J enriquecidas en PUFAs n-3, Mn-3.

*Relación apoptosis/necrosis*

**Figura 35.** Relación apoptosis/necrosis. **A.** Relación apoptosis/necrosis en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J no enriquecidas en ácidos grasos, NM. **B.** Relación apoptosis/necrosis en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J enriquecidas en ácido oleico, MO. A la derecha de la gráfica aparece una ampliación de la escala con el fin de apreciara las diferencias entre grupos **C.** Relación apoptosis/necrosis en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J enriquecidas PUFAs n-3, Mn-3.

La figura 35 muestra el índice de la relación apoptosis/necrosis en cada uno de los grupos experimentales. Esta figura está dividida en tres gráficas, A, B y C. En la gráfica A se indican los valores de los grupos con membranas no modificadas. En la gráfica B los grupos con membranas modificadas en oleico. En la C se representan los resultados correspondientes los grupos de células con membranas modificadas en PUFAs n-3.

En la figura 35 se observa que los grupos pertenecientes a las membranas modificadas en oleico (B), presentan los índices de apoptosis/necrosis más bajos. Sin embargo, en los grupos no modificado (A) y enriquecidos en omega-3 (C) esta relación si se ve afectada por el tratamiento administrado. Dentro de estos niveles tan bajos que muestra el grupo oleico, en la ampliación de la gráfica 35 B se aprecia que el grupo MOHT es el que presenta el valor más pequeño (0.05) y el de mayor índice, el grupo Ce-8MOHT con un 0.3. El resto de valores permanecen intermedios. Concretamente, en la figura 35 A se aprecia un aumento de esta relación en todos los grupos con respecto al grupo NM.

La figura 35 C. muestra que es el grupo Ce-7Mn-3 el que presenta un índice apoptosis/necrosis mayor, 4.9, en comparación con el resto de grupos omega-3. Y el grupo Ce-7Mn-3HT el que menor, 0.03. Por otra parte, se observa que el grupo Ce-8Mn-3HT presenta un valor menor que Ce-8Mn-3

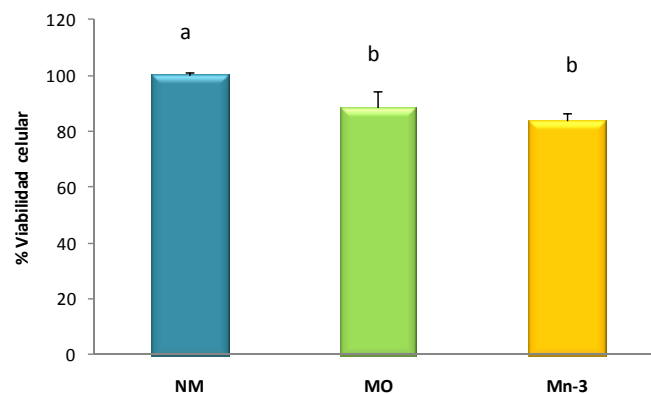
Si comparamos la relación apoptosis/necrosis entre los grupos Mn-3, NM y MO, es el grupo Mn-3 el que presenta un índice mayor, 0.41, en comparación con un 0.07 en NM y 0.15 en MO (figura 35 C, A y B. respectivamente).

### ***MTT***

Se utilizó el ensayo del MTT para determinar el posible efecto citotóxico de los diferentes tratamientos aplicados sobre la línea celular AR42J.

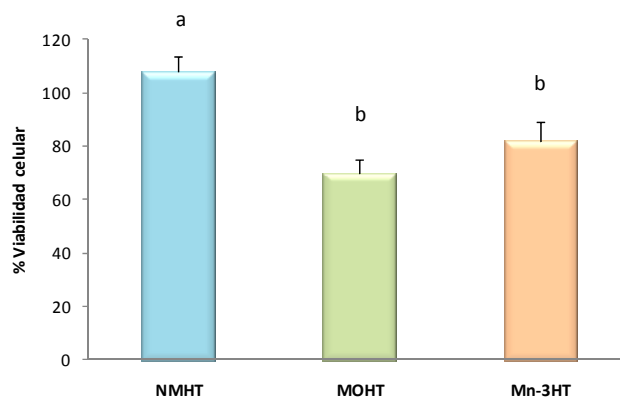
Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas se expresa como porcentaje de viabilidad, respecto al grupo NM, y es proporcional a la cantidad de formazán producido.

En principio, con respecto a los cambios que conciernen a la modificación del perfil lipídico de la membrana, en la figura 36 se observa que esta modificación disminuye la viabilidad, presentando los grupos MO y Mn-3 una porcentaje menor al grupo NM ( $P=0.007$  y  $0.001$ , respectivamente). Sin embargo no existen diferencias significativas entre MO (88.6%) y Mn-3 (84.1%), ambos con un porcentaje medio de viabilidad similar.



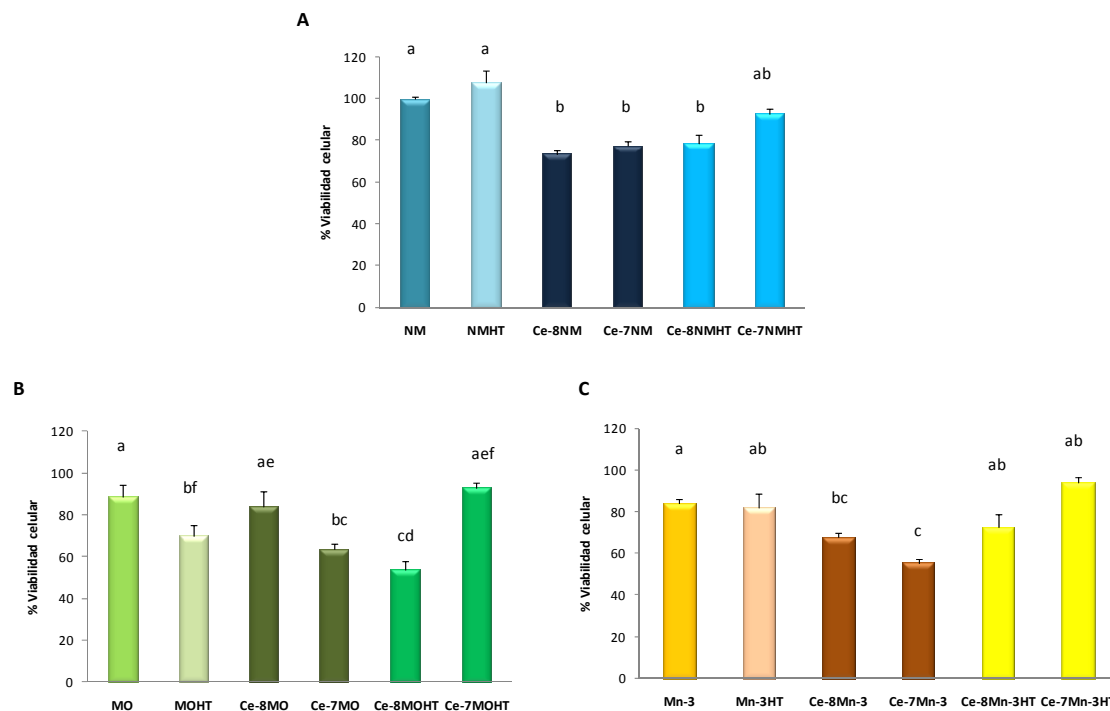
**Figura 36.** Porcentaje de viabilidad celular (% viabilidad celular) en células AR42J con membranas no modificadas (NM), modificadas en ácido oleico (MO) y en PUFAs n-3 (Mn-3). Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM. En el grupo NM, N= 147; en el grupo MO, N= 90; y en el grupo Mn-3, N= 63 . Letras diferentes expresan diferencias significativas ( $P<0,05$ ).

Esta disminución en los grupos con membranas modificadas se hace mucho más pronunciada cuando los tratamos con HT, figura 37, mientras que en ausencia de HT era el grupo Mn-3 el que presentaba menor viabilidad (figura 36). El tratamiento con dicho antioxidante produce una caída mucha más destacada en el grupo MOHT, con un porcentaje de viabilidad del 69.6%, frente al 107% que muestra el grupo NMHT, y el 82% en el grupo Mn-3HT. Tanto el grupo MOHT como el Mn-3HT presentan diferencias significativas con el grupo NMHT ( $P=0,000$ ).



**Figura 37.** Efecto del hidroxitirol (HT) en los diferentes grupos de células AR42J con membranas con y sin modificar, grupos NMHT, MOHT y Mn-3HT. Porcentaje de viabilidad celular presente en cada uno de esos grupos. Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM. N= 43 en los tres grupos. Letras diferentes expresan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

El estudio sobre la citotoxicidad de un determinado tratamiento dentro de un mismo grupo de membrana se representa en la figura 38. Esta figura está dividida en tres gráficas, A, B y C. La gráfica A indica el porcentaje de viabilidad de cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J con membranas no modificadas. En la gráfica B se muestran la correspondiente a los grupos de células con membranas modificadas en ácido oleico. Y en la C. se representan los resultados correspondientes a este parámetro en los grupos de células con membranas modificadas en PUFAsn-3.



**Figura 38.** Porcentaje viabilidad celular. **A.** % de viabilidad celular en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J con membranas no modificadas. **B.** % viabilidad en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J modificadas en ácido oleico. **C.** % viabilidad en cada uno de los grupos experimentales pertenecientes a células AR42J modificadas con ácidos PUFAs n-3.

Si nos fijamos en la figura 38 A, células AR42J cuyas membranas no están modificadas, podemos ver un ligero aumento de viabilidad en el grupo NMHT, aunque no existan diferencias significativas ( $P=0.15$ ) con respecto al grupo NM. El tratamiento con ceruleína  $10^{-8}$  M, grupo Ce-8NM, produce una disminución estadísticamente significativa ( $P=0.000$ ) con respecto a NM. Esta disminución, fuertemente significativa con respecto a NM, también se encuentra en el grupo Ce-7NM. Los grupos Ce-8NM y Ce-7NM manifiestan porcentajes similares. Entre el grupo Ce-8NM y Ce-8NMHT no existen diferencias significativas. Sin embargo, la presencia de HT, cuando se tratan con ceruleína  $10^{-7}$  M, provoca en estas células un aumento de la viabilidad, no existiendo diferencias significativas entre los grupo NM y Ce-7NMHT.

Con respecto a las células AR42J con membranas modificadas con ácido oleico, figura 38 B, cabe resaltar la fuerte disminución del grupo MOHT respecto al grupo MO ( $P=0.001$ ). El tratamiento con ceruleína  $10^{-8}$  M no modifica la viabilidad en estas células. Tienen que

tratarse con una concentración mayor, grupo Ce-7MO, para que se observe una disminución significativa con respecto a NM. La presencia de HT en el tratamiento con ceruleína  $10^{-8}$  M, grupo Ce-8MOHT, produce una disminución estadísticamente significativa con respecto a las tratadas con esa dosis de ceruleína pero en ausencia de HT, grupo Ce-8MO. Sin embargo, el grupo Ce-7MOHT presenta un aumento significativo con respecto al grupo Ce-7MO, alcanzando valores semejantes al grupo MO, 93.7% de viabilidad.

Por último, la figura 38 C reproduce los porcentajes de viabilidad que presentan los diferentes grupos experimentales de células AR42J con membranas modificadas con PUFAs n-3. El tratamiento con HT no afecta a la viabilidad en este grupo de membranas, no existiendo diferencias significativas entre Mn-3 y Mn-3HT. El tratamiento con ceruleína parece disminuir significativamente la funcionalidad mitocondrial en estas células, aunque no existen diferencias entre los grupos tratados con diferentes dosis, Ce-8Mn-3 y Ce-7Mn-3. El aumento que experimentan los grupos Ce-8Mn-3HT y Ce-7Mn-3HT es proporcional a la disminución experimentada en los grupos Ce-8Mn-3 y Ce-7Mn-3. De modo, que la recuperación del grupo Ce-7Mn-3HT con respecto al grupo Ce-7Mn-3 es mayor a la observada entre el grupo Ce-8Mn-3HT y Ce-8Mn-3.

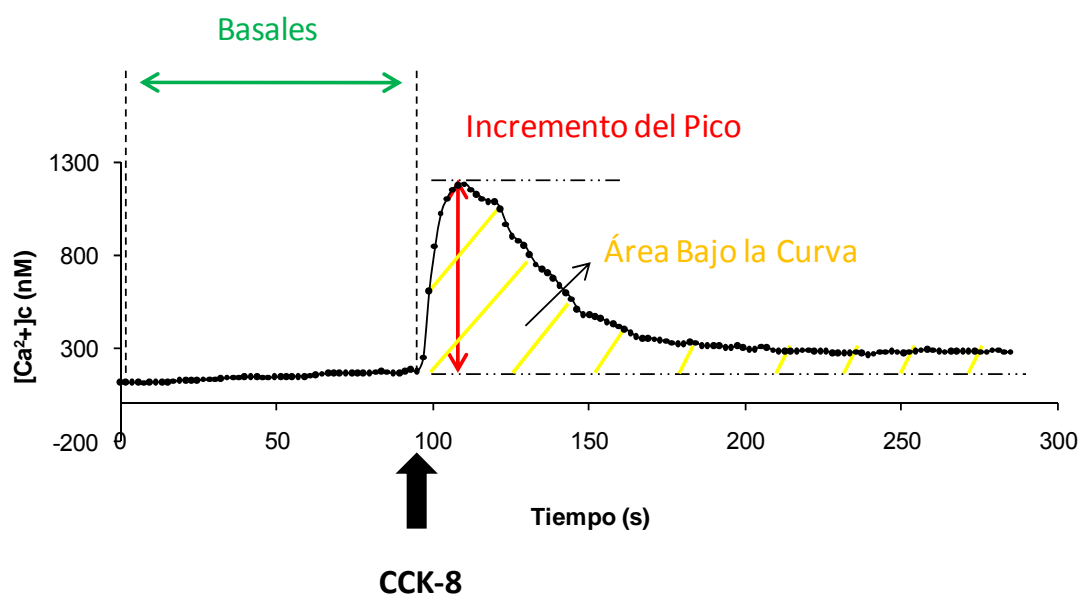
## Funcionalidad Celular

### *Determinación de la concentración de $Ca^{2+}$ citosólico.*

Los cambios en la concentración de calcio citosólico inducidos por la estimulación con CCK-8 ( $10^{-9}$  M) se determinaron en suspensiones celulares de cada uno de los grupos experimentales. El análisis se hizo a través de fluorimetría mediante el uso de la sonda Fura-2-acetoximetil ester, a menudo abreviado como Fura-2AM.

El resultado de este estudio es una gráfica donde se representa la evolución temporal de la  $[Ca^{2+}]_c$  inducida por CCK-8 ( $10^{-9}$  M) como la que se muestra en la figura 1. Se trata de la típica respuesta de  $Ca^{2+}$ , en células acinares en suspensión, ante este secretagogo y consistente en un rápido y marcado incremento de la  $[Ca^{2+}]_c$ , seguido de un lento y progresivo descenso hasta estabilizarse en un nivel por encima del basal.

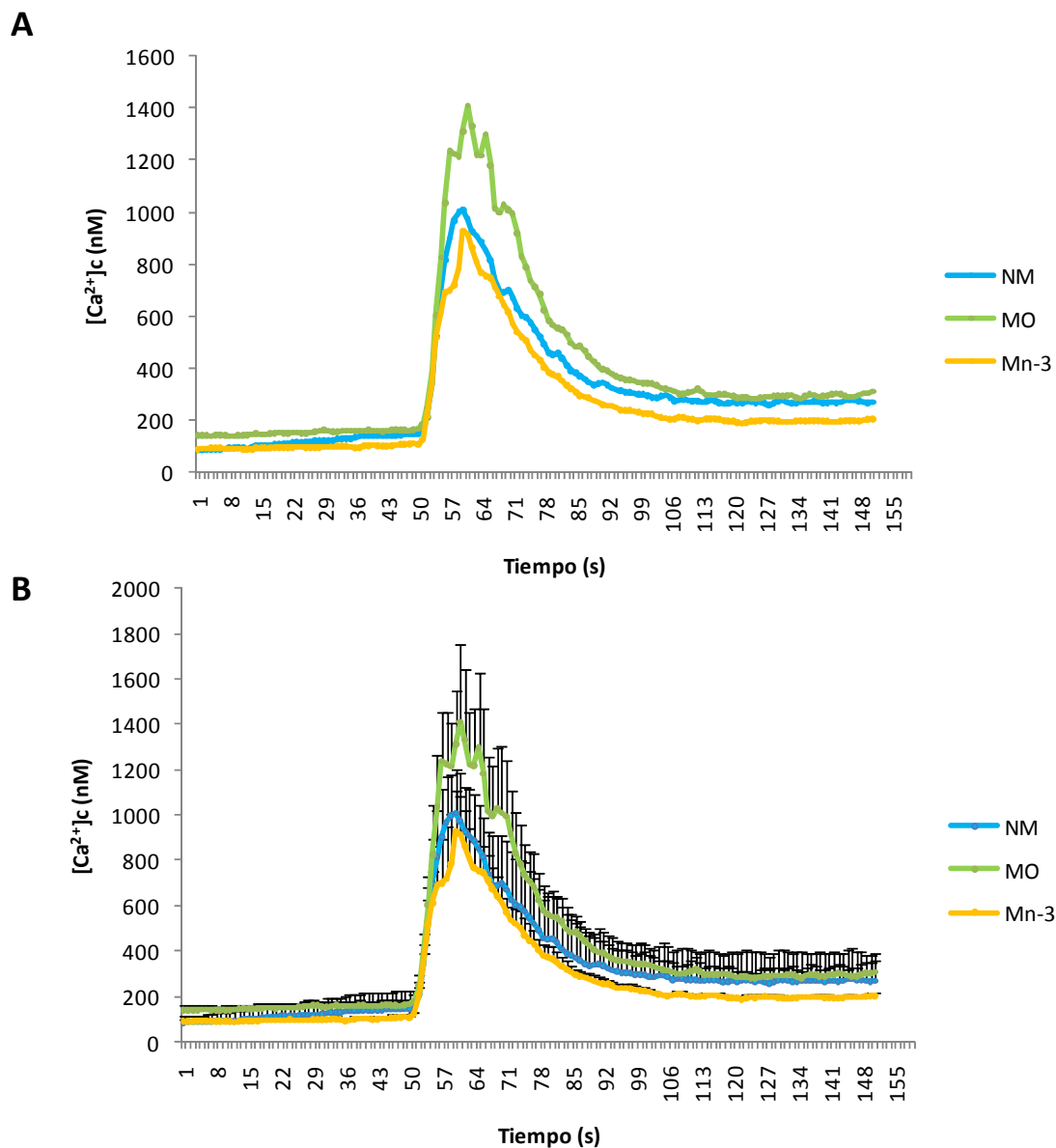
Una vez que se obtuvieron estas curvas en todos los grupos experimentales, se analizaron 4 parámetros como se muestra en la figura 39. Estos son: el promedio de los valores basales de  $[Ca^{2+}]_c$  en cada uno de los grupos; el incremento del pico (IP) tras la adición de la CCK-8, el cual se obtiene de la diferencia entre el valor máximo alcanzado tras la adición de la CCK-8 y el promedio de los valores basales; el área bajo la curva (ABC); y el índice IP/ABC, indicativo de la forma de la curva tras el estímulo.



**Figura 39.** Esquema de las diferentes zonas que se analizaron de la curva típica de evolución temporal de  $[Ca^{2+}]_c$  inducida por CCK-8. La flecha indica el tiempo al cual se le añade el estímulo, CCK-8 ( $10^{-9}$  M). La primera zona corresponde a las  $[Ca^{2+}]_c$  basales. Tras el estímulo se analiza tanto el incremento del pico (IP) como el área bajo la curva (ABC).

En la figura 40 se muestra las diferencias en esta evolución temporal entre los grupos NM, MO y Mn-3. Se aprecia una respuesta más elevada por parte de las células AR42J modificadas con ácido oleico (MO), con respecto a las no modificadas (NM) y las modificadas en omega-3 (Mn-3).





**Figura 40.** Evolución en el tiempo de los cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico inducidos por CCK-8 ( $10^{-9}$  M) en células AR42J controles (NM) y en células enriquecidas en oleico y en omega-3 (MO y Mn-3). N=6 para los tres grupos experimentales. **A.** Los valores están expresados como la media sin  $\pm$  EEM, con el fin de apreciar la forma de cada una de las curvas. **B.** Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM.

A continuación se describen los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros de la curva que se han analizado.

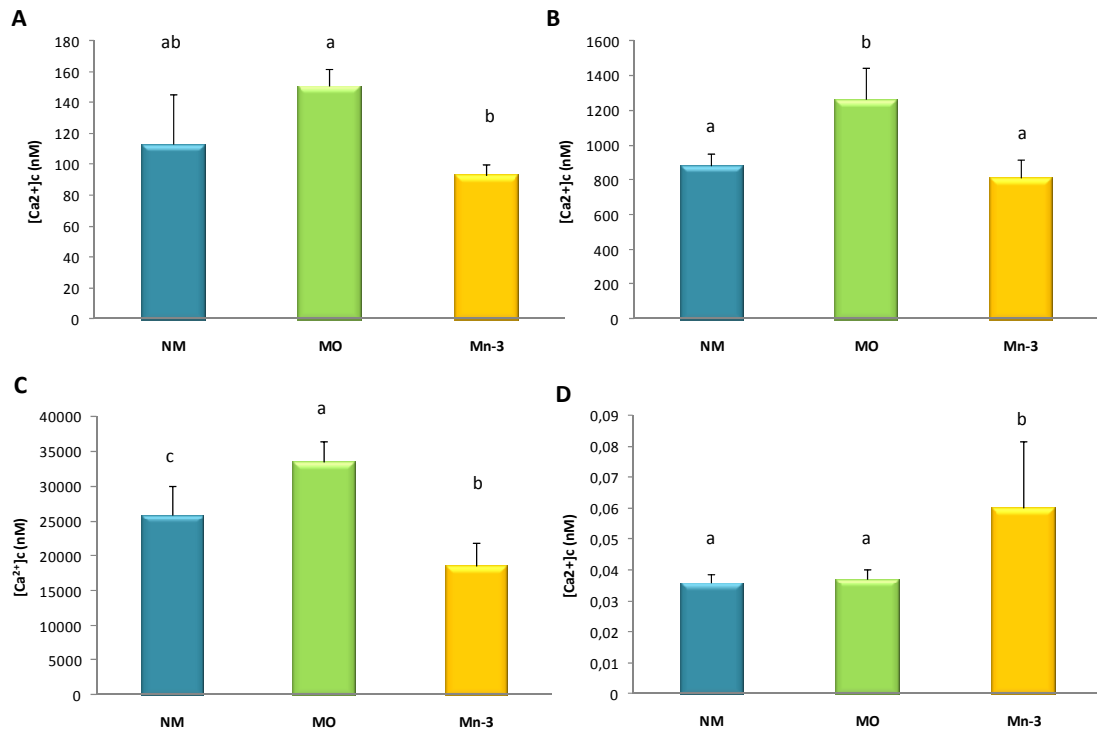
### *Concentraciones basales de calcio citosólico*

En la figura 41 A. se muestran las  $[Ca^{2+}]_c$  basales en los grupos NM, MO, y Mn-3. Al comparar estos tres grupos, los cuales no han sido tratados ni con HT ni con ceruleína, se puede ver el efecto que tiene la modificación del perfil lipídico de la membrana en la respuesta funcional del calcio citosólico ante un secretagogo. Se observa que el grupo Mn-3 presenta las concentraciones basales más bajas ( $93.3 \pm 7$  nM, n=6), significativamente ( $P < 0,05$ ), con respecto a los grupos NM y MO. Aunque no existen diferencias significativas entre la  $[Ca^{2+}]_c$  basal del grupo NM y MO, existe una tendencia ( $p=0,1$ ) a ser mayor en el grupo MO ( $150.5 \pm 11.6$  nM, n=6) que en el grupo NM ( $113.7 \pm 31.5$  nM, n=6).

Similar es lo observado en los valores de ABC e IP, figuras 41 B y C. El grupo Mn-3 también presenta los valores más bajos, estadísticamente significativos ( $P < 0,05$ ), con respecto a los grupos NM y MO. Respecto al IP no existen diferencias significativas entre los grupos NM y Mn-3, mientras que el grupo MO presenta un mayor incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$  respecto a los grupos anteriores ( $P < 0,05$ ).

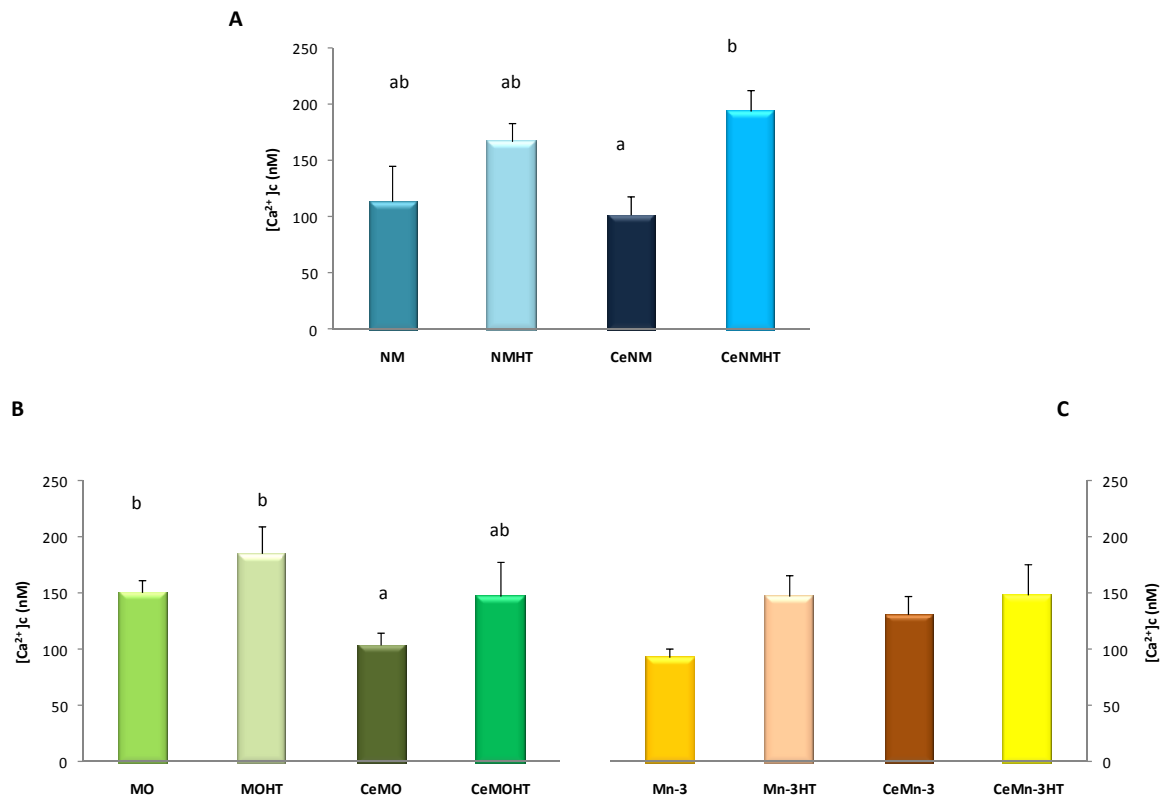
Por último, índice IP/ABC, que se muestra en la figura 41 D, es mayor en el grupo Mn-3 ( $0.06 \pm 0.02$ , n=6) que en los otros dos grupos, NM ( $0.04 \pm 0.003$ , n=6) y MO ( $0.04 \pm 0.002$ , n=6), existiendo diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

En la figura 42 se observan las concentraciones basales de calcio citoplasmático en los diferentes grupos experimentales. Está dividida en tres gráficas. La gráfica A muestra los valores de este parámetro que se han obtenido en los diferentes modelos experimentales de células AR42J con membranas no modificadas. En la gráfica B se representan los valores que alcanzan los grupos de células AR42J modificadas en oleico. Y finalmente, la gráfica C se refiere los valores basales de los grupos de células AR42J modificadas con omega-3.



**Figura 41.** Efecto del enriquecimiento de la membrana plasmática en referencia a las concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Los valores expresan la media  $\pm$  EEM ( $n=6$  en todos los grupos). Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ( $P<0.05$ ). **A.**  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  basal (nM) **B.**  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  tras la estimulación con CCK-8 (1nM), hasta alcanzar su valor máximo. Incremento del Pico (IP) **C.**  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  desde la estimulación con CCK-8 hasta el descenso estabilizado por encima de los niveles basales. Área bajo la curva (ABC) **D.** IP/AU

Como se observa en la figura 42 A, la presencia de HT en el medio de cultivo, grupo NMHT ( $167.15 \pm 16.7$  nM,  $n=6$ ), incrementa ligeramente la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  basal, aunque sin diferencias significativas. Sin embargo, la presencia de ceruleína  $10^{-8}$  M durante 24 h, en ausencia de HT, grupo CeNM, provoca una fuerte disminución en dichas concentraciones basales ( $P<0,05$ ). Al añadir ceruleína pero en presencia de HT, grupo CeNMHT las  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  basales son similares a las obtenidas en los grupos NM y NMHT, y significativamente mayores ( $P<0,05$ ) al grupo CeNM.



**Figura 42.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> basales (nM). Los valores expresan la media  $\pm$  EEM (n=6-7). Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos (P<0.05). **A.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> basales en suspensiones celulares de los diferentes grupos experimentales de células AR42J no modificadas (NM); no modificadas incubadas 26 h con HT (50 $\mu$ M) (NMHT); no modificadas incubadas 24 h con ceruleina 10<sup>-8</sup> M en ausencia de HT (CeNM); no modificadas incubadas 26 h con HT (50 $\mu$ M) de las cuales las últimas 24 horas en presencia de ceruleina 10<sup>-8</sup> M (CeNMHT). Promedio Basal NM B. Promedio Basal MO C. **B.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> basales en suspensiones celulares de los diferentes grupos experimentales de células AR42J enriquecidas en ácido oleico (MO); MO incubadas 26 h con HT (50 $\mu$ M) (MOHT); MO incubadas 24 h con ceruleina 10<sup>-8</sup> M en ausencia de HT (CeMO); MO incubadas 26 h con HT (50 $\mu$ M) de las cuales las últimas 24 horas en presencia de ceruleina 10<sup>-8</sup> M (CeMOHT). **C.** Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> basales en suspensiones celulares de los diferentes grupos experimentales de células AR42J enriquecidas en omega 3 (Mn-3); Mn-3 incubadas 26 h con HT (50 $\mu$ M) (Mn-3HT); Mn-3 incubadas 24 h con ceruleina 10<sup>-8</sup> M en ausencia de HT (CeMn-3); Mn-3 incubadas 26 h con HT (50 $\mu$ M) de las cuales las últimas 24 horas en presencia de ceruleina 10<sup>-8</sup> M (CeMn-3HT).

La figura 42 B, muestra al igual que en los grupos no modificados (figura 42 A), un ligero aumento en la concentración basal al ser tratadas con HT, grupo MOHT ( $185.6 \pm 23.7$  nM,  $n=6$ ), aunque no es significativo. Sin embargo al tratarlas con ceruleína, grupo CeMO, esta concentración basal disminuye significativamente ( $P<0,05$ ). La incubación de estas células con ceruleína, en presencia de HT, grupo CeMOHT, muestra valores similares a los obtenidos en MO y MOHT, siendo por tanto significativamente mayores ( $P<0,05$ ) a las tratadas con ceruleína, CeMO.

En el caso de las células AR42J con membranas modificadas en omega-3, No existen diferencias significativas en la  $[Ca^{2+}]_i$  los diferentes grupos experimentales, figura 42 C. Si bien, el grupo Mn-3HT presenta unos valores ligeramente mayores a los obtenidos en el grupo Mn-3 ( $147.4 \pm 18.4$  nM,  $n=7$  frente  $93.3 \pm 7$  nM)

### *Evolución temporal de la concentración citosólica de calcio tras la estimulación con CCK-8*

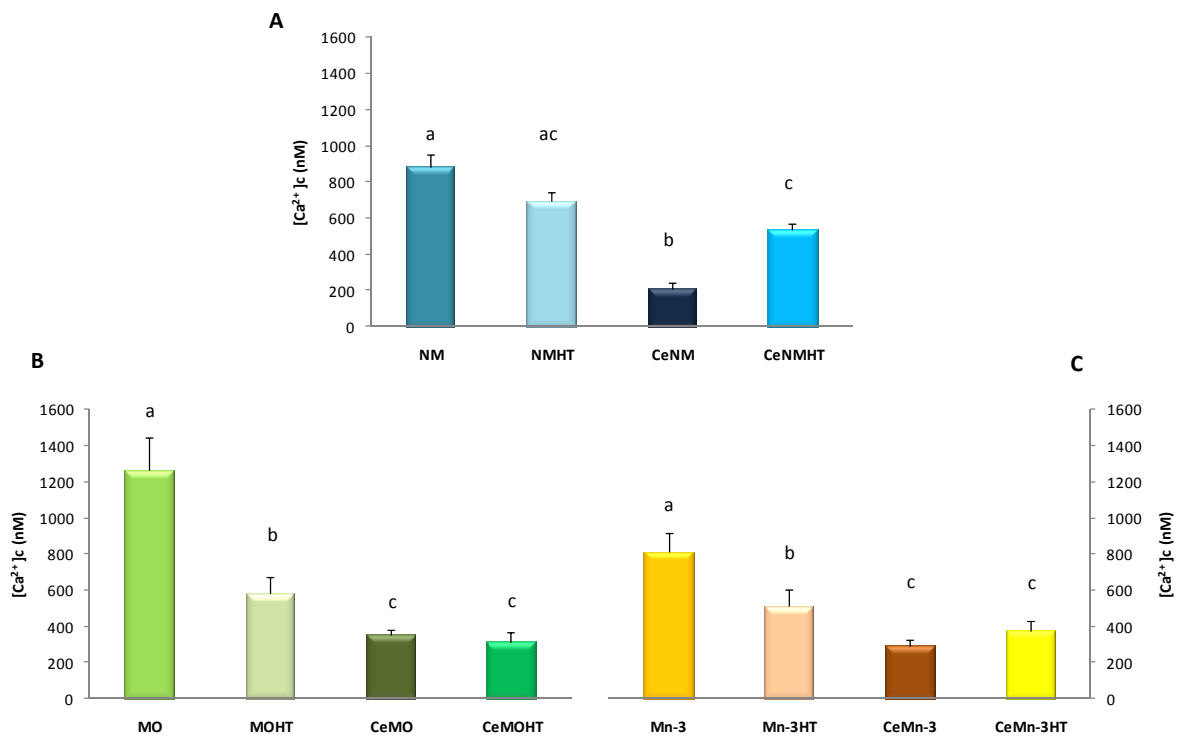
#### Incremento del Pico

La figura 43 representa el Incremento del Pico (IP) en los diferentes grupos experimentales. Está dividida en tres gráficas. La gráfica A muestra los valores de este parámetro, obtenidos en los diferentes modelos experimentales de células AR42J no modificadas. En la gráfica B se representan los valores que alcanzan los grupos de células AR42J modificadas en oleico. Y finalmente, la gráfica C se refiere al incremento del pico de los grupos de células AR42J modificadas con omega-3.

En la figura 43 A, se observa que los grupos NM, NMHT y CeNMHT muestran incrementos similares mientras que el grupo CeNM presenta una concentración significativamente menor ( $P<0,05$ ).

El patrón que se contempla en la figura 43 B, muestra una disminución significativa ( $P<0,05$ ) de esta respuesta en el grupo MOHT con respecto al grupo MO. Este descenso es mucho más acusado en los grupos CeMO y CeMOHT ( $P<0,05$ ), que disminuyen paralelamente. Existe por tanto, diferencias significativas entre MOHT frente CeMOHT, y MO frente CeMO.

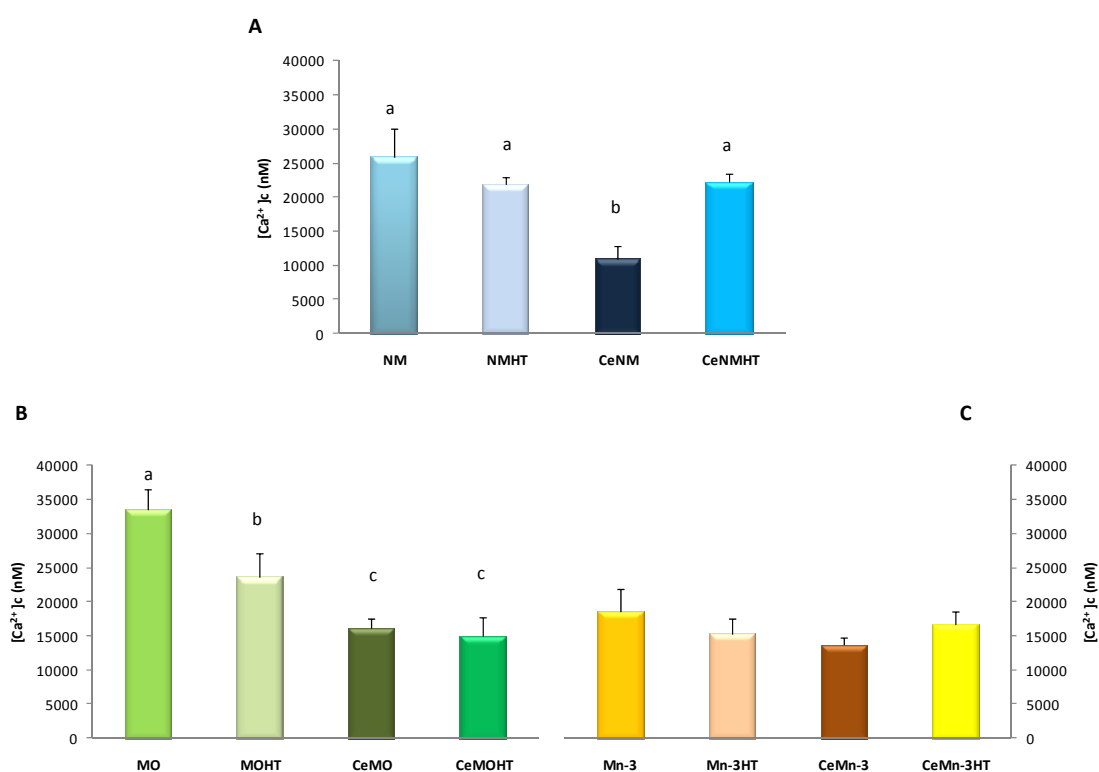
La figura 43 C, muestra un comportamiento similar al observado en la figura 43 B. Un descenso significativo ( $P < 0.05$ ) del grupo Mn-3HT con respecto al grupo Mn-3, pero mayor, también significativamente, a los grupos CeMn-3 y CeMn-3HT. No existen diferencias significativas entre CeMn-3 frente CeMn-3HT, aunque se aprecia un ligero aumento en CeMn-3H ( $P = 0.26$ ).



**Figura 43.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> (nM), Incremento del Pico (IP). Los valores expresan la media  $\pm$  EEM ( $n=6-7$ ). Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ). **A.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> en el IP de los grupos experimentales de células AR42J NM, NMHT, CeNM y CeNMHT. **B.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> en el IP de los grupos experimentales de células AR42J MO, MOHT, CeMO y CeMOHT. **C.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> en el IP de los grupos experimentales de células AR42J Mn-3, Mn-3HT, CeMn-3 y CeMn-3HT.

## Área Bajo la Curva

La figura 44 representa el área bajo la curva (ABC) en los diferentes grupos experimentales. Está dividida en tres gráficas. La gráfica A muestra los valores obtenidos de este parámetro, en los diferentes modelos experimentales de células AR42J no modificadas. En la gráfica B se representan los valores que alcanzan los grupos de las células AR42J modificadas en oleico. Finalmente, la gráfica C se refiere al ABC de los grupos de células AR42J modificadas con omega-3.



**Figura 44.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> (nM), área bajo la curva (ABC). Los valores expresan la media  $\pm$  EEM (n=6-7). Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos (P<0.05). **A.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> del ABC en los grupos experimentales de células AR42J NM, NMHT, CeNM y CeNMHT. **B.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> del ABC en los grupos experimentales de células AR42J MO, MOHT, CeMO y CeMOHT. **C.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> del ABC en los grupos experimentales de células AR42J Mn-3, Mn-3HT, CeMn-3 y CeMn-3HT.

Las áreas bajo la curva de los grupos NM, NMHT y CeNMHT son similares entre ellas, mientras que la del grupo CeNM es significativamente menor ( $P < 0,05$ ) a las de los anteriores grupos, figura 44 A.

En la figura 44 B, al igual que ocurría con el incremento del pico en estos grupos (figura 43 B), se advierten una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) del grupo CeMO respecto al grupo MO y de grupo CeMOHT frente a MOHT. La disminución significativa ( $p = 0,008$ ) de MOHT frente MO se vuelve a repetir en este parámetro.

La figura 44 C evidencia valores no diferentes significativamente entre los grupos modificados en omega-3.

### Relación IP/ABC

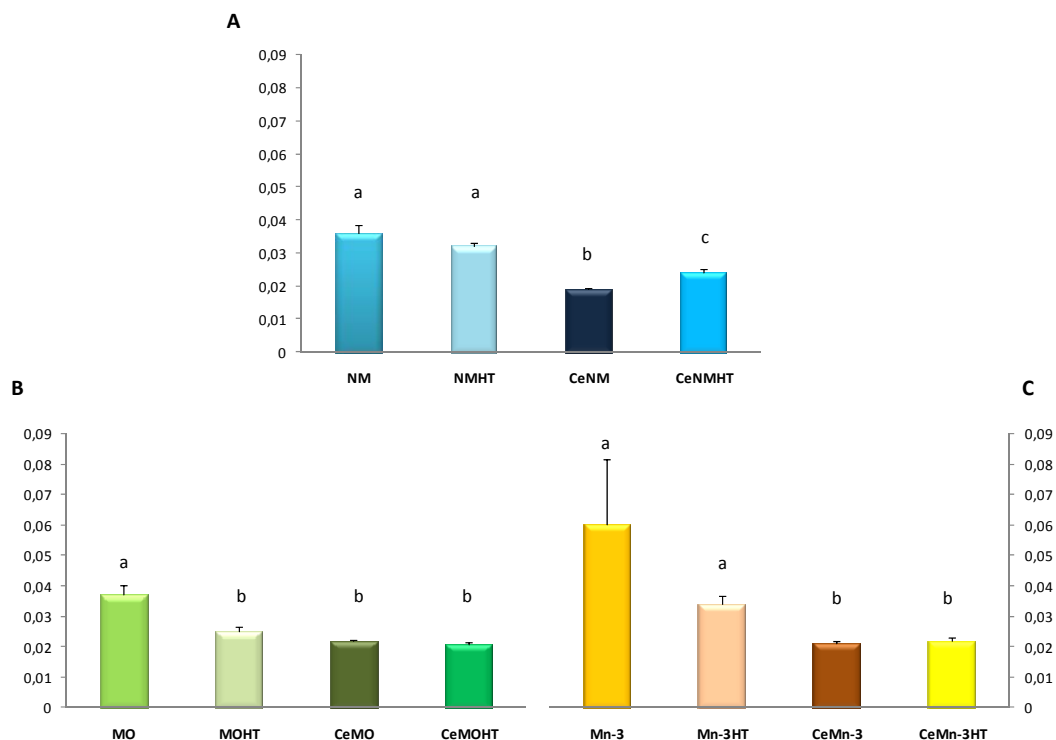
Este índice es indicativo de la forma de la curva ya que nos orienta sobre lo mantenida que es la respuesta en el tiempo. Se representa en la figura 45 que está dividida en tres gráficas. La gráfica A muestra los valores obtenidos de este parámetro, en los diferentes modelos experimentales de células AR42J no modificadas. En la gráfica B se representan los valores que alcanzan los grupos de las células AR42J modificadas en oleico. Y finalmente, la gráfica C se refiere al ABC de los grupos de células AR42J modificadas con omega-3.

En la figura 45 A se observa que los grupos NM y NMMHT tienen valores similares de índice IP/ABC y mayores, estadísticamente significativos ( $P < 0,05$ ), a los grupos CeNM y CeNMHT. Siendo el índice en este último, CeNMHT, mayor significativamente, respecto al CeNM.

Los grupos MOHT y CeMO presentan índices IP/ABC similares entre ellos pero menores, significativamente ( $P < 0,05$ ), figura 45 B. Entre los grupos MOHT y CeMOHT no existen diferencias significativas.

Los índices IP/ABC de los grupos Mn-3 y Mn-3HT, figura 45 C, son similares entre ellos. CeMn-3 presenta un índice significativamente menor al de Mn-3, al igual que CeMn-3HT respecto a Mn-3HT.





**Figura 45.** Índice IP/ABC. Los valores expresan la media  $\pm$  EEM (n=6-7). Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ ). **A.** IP/ABC de los grupos experimentales de células AR42J NM, NMHT, CeNM y CeNMHT. **B.** IP/ABC de los grupos experimentales de células AR42J MO, MOHT, CeMO y CeMOHT. **C.** IP/ABC de los grupos experimentales de células AR42J Mn-3, Mn-3HT, CeMn-3 y CeMn-3HT.

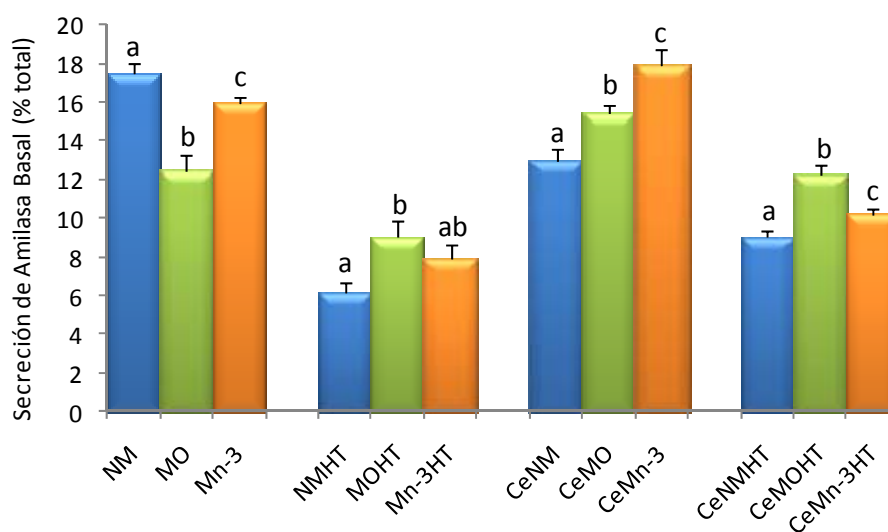
## ***Secreción de Amilasa***

### *Secreción basal de amilasa*

Los valores basales de secreción de amilasa de los doce grupos experimentales se muestran en la figura 46. Al comparar los grupos NM, MO y Mn-3, se observó que la secreción de amilasa basal fue significativamente diferente en los tres grupos, siendo mayor en el grupo NM ( $17,53 \pm 0,52$ ) que en los grupos Mn-3 ( $15,93 \pm 0,36$ ) y MO ( $12,44 \pm 0,79$ ). Cuando estos grupos se trataron con HT, el grupo MOHT ( $9,09 \pm 0,77$ ) secretó significativamente más amilasa que el grupo NMHT ( $6,14 \pm 0,53$ ), mientras que el grupo Mn-3HT ( $7,87 \pm 0,71$ ) mostró un valor intermedio de secreción que no fue estadísticamente diferente de los otros dos grupos (NMHT, MOHT). Cuando las células AR42J se trataron con ceruleína, la secreción basal del grupo CeMn-3 ( $17,94 \pm 0,85$ ) fue significativamente mayor que los

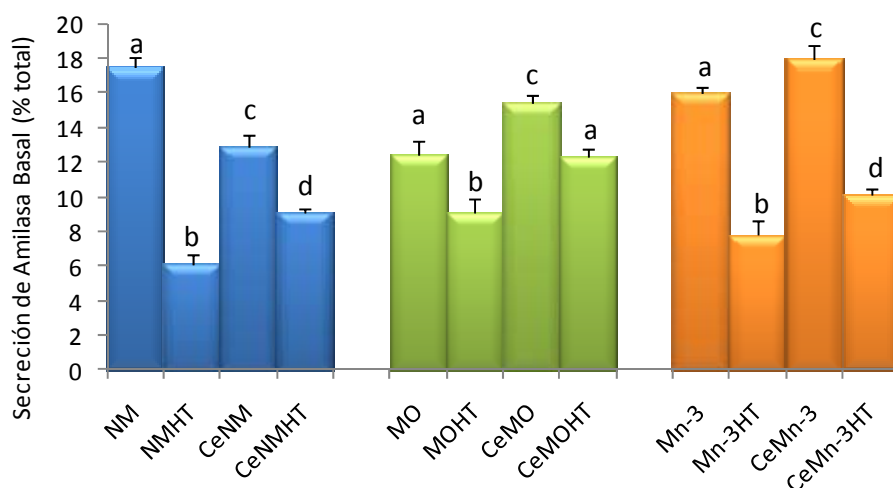
grupos CeMO ( $15,44 \pm 0,44$ ) y CeNM ( $12,94 \pm 0,60$ ). Por otra parte, cuando las células fueron tratadas tanto con HT como con ceruleína, el grupo CeMOHT ( $12,28 \pm 0,49$ ) fue el que secretó mayor cantidad de amilasa neta que los grupos CeMn-3HT ( $10,13 \pm 0,31$ ) y CeNMHT ( $9,03 \pm 0,29$ ).

Cuando se analiza el efecto de ceruleína sobre las células AR42J enriquecidas con diferentes ácidos grasos, podemos observar que ceruleína produjo un aumento significativo de la secreción de amilasa basal en el grupo CeMO de un 24% y en el grupo CeMn-3 de un 12% respecto a los grupos sin tratar (MO y Mn-3), a diferencia del grupo CeNM, en donde la ceruleína produjo una disminución de la secreción de amilasa basal en un 26%, respecto al grupo NM. Cuando las células incubadas previamente con HT fueron tratadas con ceruleína, la secreción de amilasa basal aumentó significativamente entre 28 y 47% en los tres grupos (CeNMHT, CeMOHT, CeMn-3HT) respecto a los grupos tratados solo con HT (NMHT, MOHT, Mn-3HT; Figura 47).



**Figura 46.** Secreción de amilasa basal (% del total) en células acinares pancreáticas AR42J incubadas durante 72h en medio estándar (NM) o en medio enriquecido en C18:1  $\omega$ -9 (MO) o en PUFA n-3 (Mn-3) en presencia de DX (100 nM). Tras cambiar el medio, las células AR42J se trataron con (NMHT, MOHT, Mn-3HT) o sin HT (50 $\mu$ M) durante 2 h, seguidamente se trataron con (CeNM, CeMO, CeMn-3, CeNMHT, CeNMHT, CeMn-3HT) o sin ceruleína ( $10^{-8}$  M, 24 h). Letras diferentes expresan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Las comparaciones estadísticas en esta figura están enfocadas a ver las diferencias entre grupos de membranas para un mismo tratamiento.

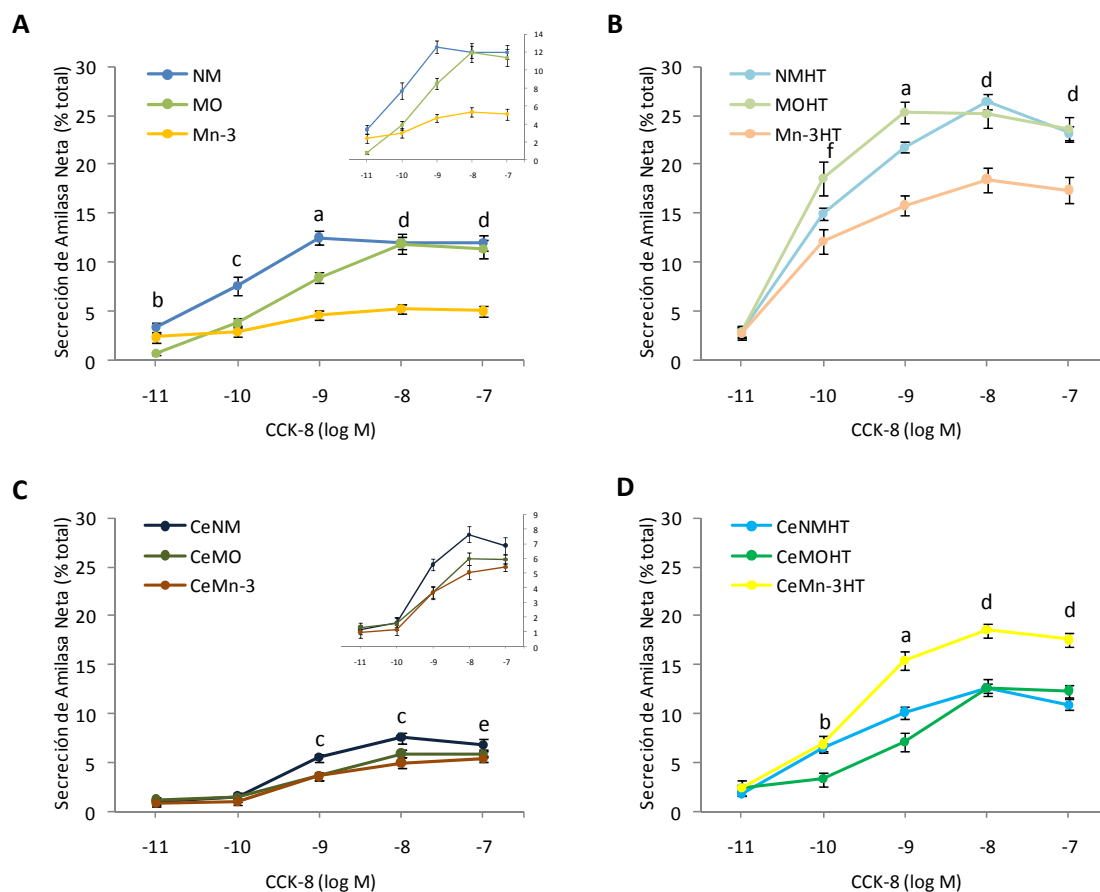
Cuando se analiza el efecto de HT sobre las células AR42J enriquecidas con diferentes ácidos grasos, podemos observar que HT disminuyó significativamente la secreción de amilasa basal en los grupos NMHT, MOHT y Mn-3, en 65, 27 y 51% respectivamente, en comparación con los grupos sin tratar (NM, MO, Mn-3). Mientras que cuando las células AR42J tratadas con ceruleína fueron incubadas previamente con HT (CeNMHT, CeMOHT y CeMn-3HT) se produjo una disminución significativa de la secreción de amilasa basal en comparación con los grupos CeNM, CeMO y CeMn-3, en especial del grupo CeMn-3HT, en donde el HT redujo la secreción de amilasa basal en un 44% (figura 47).



**Figura 47.** Efecto de ceruleína e hidroxitirosol sobre la secreción de amilasa basal (% del total) en células acinares pancreáticas AR42J incubadas durante 72h en medio estándar (NM) o en medio enriquecido en C18:1  $\omega$ -9 (MO) o enPUFA n-3 (Mn-3) en presencia de DX (100 nM). Tras cambiar el medio, las células AR42J se trataron con (NMHT, MOHT, Mn-3HT) o sin HT (50 $\mu$ M) durante 2 h, seguidamente se trataron con (CeNM, CeMO, CeMn-3, CeNMHT, CeNMHT, CeMn-3HT) o sin ceruleína (10<sup>-8</sup> M, 24 h).

*Secreción de amilasa neta estimulada por CCK-8*

La secreción de amilasa neta (incremento sobre la secreción basal) de los diferentes grupos experimentales estimulada por concentraciones crecientes de CCK-8 (desde  $10^{-11}$  hasta  $10^{-7}$  M) se muestra en la figura 48. Al comparar los grupos NM, MO y Mn-3, la máxima secreción de amilasa neta en respuesta a CCK-8 para el grupo NM se produjo a una concentración de  $10^{-9}$  M ( $12,56 \pm 0,71$ ), la cual se mantuvo a concentraciones más altas de CCK-8. Para los grupos MO y Mn-3, la máxima secreción de amilasa neta se alcanzó a una concentración de  $10^{-8}$  M ( $11,94 \pm 1,07$  y  $5,31 \pm 0,53$  respectivamente), y al igual que en el grupo NM, a concentraciones más altas de CCK-8, la secreción de amilasa neta se mantuvo. La secreción de amilasa neta en el grupo NM fue mayor que la secretada por los grupos MO y Mn-3 a concentraciones de CCK-8 de  $10^{-10}$  y  $10^{-9}$  M, mientras que a concentraciones mayores de CCK-8, el grupo NM solo secretó mayor porcentaje de amilasa neta que el grupo Mn-3. Por el contrario, el grupo Mn-3 secretó menos amilasa neta que los grupos NM y MO a concentraciones  $\geq 10^{-9}$  M (figura 48 A).



**Figura 48.** Secreción de amilasa neta (incremento sobre el basal) estimulada por CCK-8 ( $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  M) en células acinares pancreáticas AR42J incubadas durante 72h en medio estándar (NM) o en medio enriquecido en C18:1  $\omega$ -9 (MO) o en PUFA n-3 (Mn-3) en presencia de DX (100 nM). **A.** Células sin tratar (NM, MO y Mn-3). **B.** Tratadas con HT (50 $\mu$ M) durante 2 h (NMHT, MOHT, Mn-3HT). **C.** Tratadas con ceruleína 10-8 M durante 24 h (CeNM, CeMO, CeMn-3). **D.** Tratadas con HT (50 $\mu$ M) 2 h y seguidamente con ceruleína 10-8 M (CeNMHT, CeNMHT, CeMn-3HT). La amilasa secretada durante la incubación con CCK-8 (50 min, 37°C) se expresa como porcentaje del contenido total inicial. Los valores representan la media  $\pm$  EEM (N=15-24) proveniente de al menos dos lotes diferentes de células. Las letras a, b, c, d, e y f indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos (a: NM vs MO vs M $\omega$ 3; b: MO vs NM y Mn-3; c: NM vs MO y Mn-3; d: Mn-3 vs NM y MO; e: NM vs Mn-3; f: MO vs Mn-3).

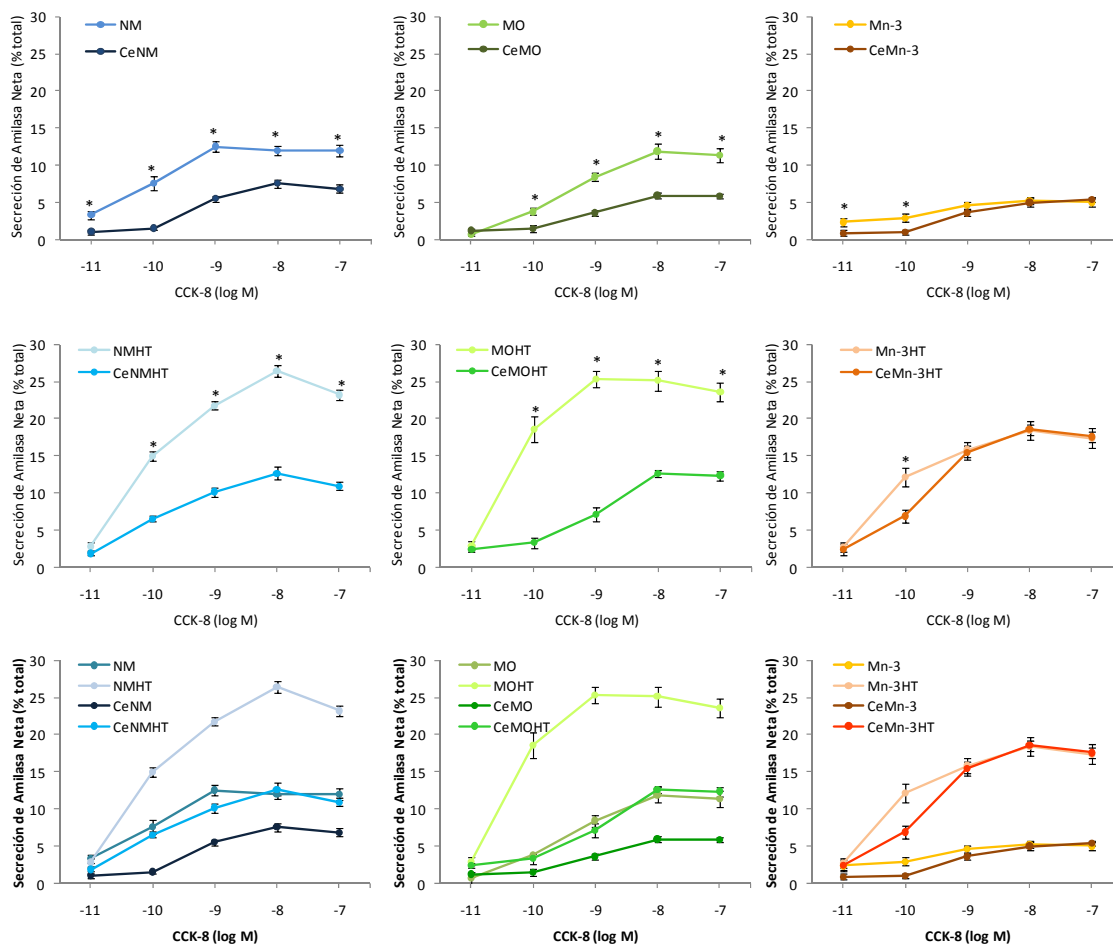
Cuando las células AR42J fueron tratadas con ceruleína, la máxima secreción de amilasa neta en respuesta a CCK-8 se produjo a una concentración de  $10^{-8}$  M, tanto para el grupo CeNM ( $7,62 \pm 0,54$ ) como para el grupo CeMO ( $5,98 \pm 0,43$ ). Para el grupo CeMn-3 la secreción máxima se produjo a una concentración de CCK-8 de  $10^{-7}$  M ( $5,42 \pm 0,27$ ). La secreción de amilasa neta en el grupo CeNM fue significativamente mayor que la secretada en los grupos CeMO y CeMn-3 a concentraciones de CCK-8 de  $10^{-9}$  y  $10^{-8}$  M, mientras que

a una concentración mayor de CCK-8 ( $10^{-7}$ M), la secreción de amilasa neta en el grupo CeNM, solo fue diferente al grupo CerM $\omega$ 3, el cual secretó menos amilasa neta que los grupos CeNM y CeMO (figura 48 C).

Cuando las células AR42J fueron tratadas con HT, la máxima secreción de amilasa neta se produjo a concentraciones de CCK-8 de  $10^{-8}$  M para los grupos NMHT ( $26,39 \pm 0,81$ ) y Mn-3HT ( $18,49 \pm 1,26$ ), a diferencia del grupo MOHT que alcanzó un mayor porcentaje de secreción de amilasa neta a una concentración de  $10^{-9}$  M ( $25,35 \pm 1,11$ ). La secreción de amilasa neta fue mayor en el grupo MOHT que la secretada por el grupo NMHT, solo a una concentración de CCK-8 de  $10^{-9}$  M, mientras que el grupo Mn-3HT secretó menos amilasa neta estimulada por CCK-8, que los grupos NMHT y MOHT, a concentraciones  $\geq 10^{-9}$  M (figura 48 B).

En relación a los grupos tratados con HT y con ceruleína, la máxima secreción de amilasa neta se produjo en respuesta a una concentración de CCK-8 de  $10^{-8}$ M en los grupos CeNMHT, CeMOHT y CeMn-3HT, además, el grupo CeMn-3HT fue el que presentó mayor secreción de amilasa neta estimulada por concentraciones de CCK-8  $\geq 10^{-9}$  M (figura 48 D).

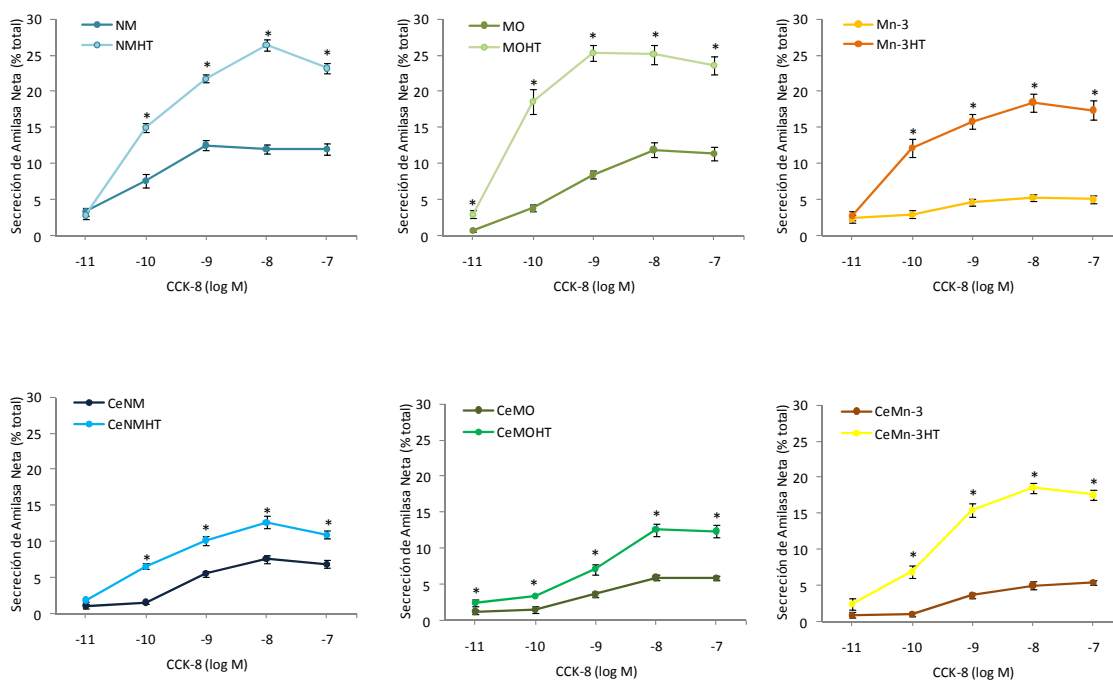
La figura 49 muestra el efecto de ceruleína sobre la secreción de amilasa neta estimulada por concentraciones crecientes de CCK-8 (desde  $10^{-11}$  hasta  $10^{-7}$ M). En general, la ceruleína disminuyó la secreción de amilasa neta estimulada por CCK-8 en todos los grupos. Al comparar los grupos tratados con o sin ceruleína, se observó que en los grupos CeMO, CeNMHT y CeMOHT la secreción de amilasa neta fue significativamente menor que los grupos MO, NMHT y MOHT, a concentraciones de CCK-8  $\geq 10^{-10}$  M. A su vez, en el grupo CeNM la ceruleína disminuyó significativamente la secreción de amilasa neta estimulada por todas las concentraciones de CCK-8 utilizadas en este estudio ( $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  M) respecto al grupo NM. Sin embargo, en los grupos CeMn-3 y CeMn-3HT, ceruleína disminuyó la secreción de amilasa neta respecto los grupos Mn-3 y Mn-3HT, solo a concentraciones de CCK-8  $\leq 10^{-10}$  M y  $10^{-10}$  M, respectivamente.



**Figura 49.** Efecto de ceruleína sobre la secreción de amilasa neta (incremento sobre el basal) estimulada por CCK-8 ( $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  M) en células acinares pancreáticas AR42J incubadas durante 72h en medio estándar (NM) o en medio enriquecido en C18:1  $\omega$ -9 (MO) o en PUFA n-3 (Mn-3) en presencia de DX (100 nM). Tras cambiar el medio, las células AR42J se trataron con (NMHT, MOHT, Mn-3HT) o sin HT (50 $\mu$ M) durante 2 h, seguidamente se trataron con (CeMN, CeMO, CeMn-3, CeNMHT, CeMOHT, CeMn-3HT) o sin ceruleína ( $10^{-8}$  M, 24 h). La amilasa secretada durante la incubación con CCK-8 (50 min, 37°C) se expresa como porcentaje del contenido total inicial. Los valores representan la media  $\pm$  EEM (n=8-24) proveniente de al menos dos lotes diferentes de células. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los grupos.

La figura 50 muestra el efecto de hidroxitirosol sobre la secreción de amilasa neta estimulada por concentraciones crecientes de CCK-8 (desde  $10^{-11}$  hasta  $10^{-7}$ M). Al comparar los grupos tratados con o sin HT, se observó que en los grupos MOHT y CeMOHT, el HT aumenta significativamente la secreción de amilasa neta estimulada por todas las concentraciones de CCK-8 utilizadas en este estudio ( $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  M), respecto a los grupos MO y CeMO. A su vez, el HT aumentó la secreción de amilasa neta en todos los

demás grupos experimentales a concentraciones  $\geq 10^{-10}$  M (NMHT, Mn-3HT, CeNMHT, CeMn3HT), respecto a los grupos sin tratar (NM, Mn-3, CeNM, CeMn-3).



**Figura 50.** Efecto de hidroxitirosol sobre la secreción de amilasa neta (incremento sobre el basal) estimulada por CCK-8 ( $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  M) en células acinares pancreáticas AR42J incubadas durante 72h en medio estándar (NM) o en medio enriquecido en C18:1  $\omega$ -9 (MO) o en PUFA n-3 (Mn-3) en presencia de DX (100 nM). Tras cambiar el medio, las células AR42J se trataron con (NMHT, MOHT, Mn-3HT) o sin HT ( $50\mu\text{M}$ ) durante 2 h, seguidamente se trataron con (CeMN, CeMO, CeM $\omega$ 3, CeNMHT, CeNMHT, CeMn-3HT) o sin ceruleína ( $10^{-8}$  M, 24 h). La amilasa secretada durante la incubación con CCK-8 (50 min,  $37^{\circ}\text{C}$ ) se expresa como porcentaje del contenido total inicial. Los valores representan la media  $\pm$  EEM (n=8-24) proveniente de al menos dos lotes diferentes de células. El asterisco indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los grupos.





# **D**ISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

Esta tesis forma parte de un proyecto de investigación cuyo objetivo era estudiar el efecto beneficioso de ingredientes funcionales de la dieta mediterránea (ácidos grasos y compuestos fenólicos) sobre procesos oxidativo-inflamatorios celulares en un modelo *in vitro* de pancreatitis aguda.

En el marco de este proyecto, queríamos conocer los posibles cambios beneficiosos (preventivos o de atenuación de la gravedad) que se pueden producir a nivel celular como consecuencia de la modificación del perfil lipídico de las membranas (enriqueciéndolas en ácidos grasos monoinsaturados, MUFAs, o en ácidos grasos poliinsaturados n-3, PUFAs n-3), en presencia o no de un compuesto fenólico, con actividad antioxidante, hidroxitirosol (HT), presente en concentraciones significativas en el aceite de oliva, con objeto de conocer el efecto *per se* de esta molécula y la existencia de posibles interacciones (sinergia, antagonismo o potenciación) de este compuesto con los efectos de la modificación lipídica de las membranas. En definitiva, si la modificación del perfil lipídico y/o la presencia de fenólicos afectaba la funcionalidad celular y la susceptibilidad de la célula acinar frente a un estímulo nocivo clásico (ceruleína) que sabemos que desencadena en estas células un proceso oxidativo-inflamatorio muy definido semejante al que desarrolla *in vivo* en animales de experimentación, una pancreatitis aguda.

A la vista de la información disponible, estos tres componentes funcionales que encontramos en la dieta Mediterránea tienen un papel muy significativo en la prevención de enfermedades crónicas propias de las sociedades occidentales. Su actuación en la atenuación de procesos oxidativos e inflamatorios parece realizarse mediante la inhibición de la expresión de citoquinas, reducción de su actividad, modificación de señales intracelulares, etc. (Wahle et al. 2004). Sin descartar otras posibilidades, el mecanismo principal del efecto antiinflamatorio del aceite de oliva y la grasa de pescado se debe a la incorporación de los ácidos grasos dietéticos en las membranas biológicas y a las propiedades que esto confiere a la célula. De hecho, trabajos realizadas anteriormente por nuestro grupo, han puesto de manifiesto que la modificación de la composición en ácidos grasos de membrana inducida por la dieta (Mataix et al. 1998; Martínez et al. 2002; Díaz et al. 2003; Martínez et al. 2003) se acompaña de marcadas diferencias en la susceptibilidad frente a un ataque oxidativo (Mataix et al. 1998; Quiles et al. 1999a; Quiles et al., 1999b;

Quiles et al. 2001; Battino et al. 2002; Yago et al. 2005) y de cambios funcionales a nivel de vías intracelulares de señalización (Martínez et al. 2004; Yago et al., 2004; Yago et al. 2006).

La pancreatitis aguda es un desorden inflamatorio cuya incidencia, aunque varía entre regiones, puede alcanzar los 80 casos anuales por 100.000 personas. En una primera fase la enfermedad presenta un proceso inflamatorio local que, debido a la liberación de citoquinas, rápidamente evoluciona hacia un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con fracaso multiorgánico. En los casos graves, la mortalidad es muy elevada (15-40%).

Entre los distintos modelos animales de pancreatitis experimental que podemos encontrar en bibliografía y que muestran similitudes bioquímicas, morfológicas y fisiopatológicas con varios aspectos de la pancreatitis humana, la producida por ceruleína es el modelo experimental más ampliamente utilizado tanto *in vivo* como *in vitro* (Yu et al. 2003). El tratamiento con ceruleína (análogo de CCK) produce una pancreatitis de curso moderado, altamente reproducible. Así pues, para estudiar los efectos beneficiosos del ácido oleico, hidroxitirosol y PUFAs n-3 hemos escogido este modelo de pancreatitis aguda por ser muy conocido, aceptado y, sobre todo, muy bien caracterizado. Nuestro modelo experimental *in vitro* utiliza la línea celular AR42J (Willemer et al. 1992; Sata et al. 1999; Steinle et al. 1999; Yu et al. 2003a; Yu et al. 2003b; Satoh et al. 2005).

Hay que resaltar que es la primera vez que se aborda este tipo de estudio en un modelo *in vitro* con esta línea celular. Mientras que el papel de la grasa dietética, y más recientemente también de muchos fitoquímicos, ha sido ampliamente estudiado en otras enfermedades con componente oxidativo-inflamatorio como la aterosclerosis (Roth y Harris, 2010), artritis reumatoide (Pattison y Winyard, 2008), colitis ulcerosa (Calder, 2008) o cáncer (Aggarwal y Shishodia, 2006), apenas se ha investigado el efecto de estos compuestos en la pancreatitis aguda. Los pocos trabajos publicados sobre este asunto se centran en evaluar la eficacia terapéutica de la administración de ácidos grasos/fitoquímicos en humanos (Wang et al., 2008) o ratas (Kilian et al., 2009; Babu et al., 2009) con pancreatitis ya establecida. Sin embargo, no existen trabajos en los que se examine la influencia de estos componentes de la dieta desde un punto de vista preventivo, es decir, mediante un modelo experimental en el que el daño se induce a posteriori, tras el tratamiento previo con los componentes bioactivos de la dieta. Creemos que todo ello imprime un carácter muy novedoso a nuestro estudio.

Otro aspecto importante de este trabajo es la utilización de dexametasona para diferenciar las células hacia un fenotipo exocrino. Las células AR42J constituyen la única línea celular actualmente disponible que mantiene muchas características de las células acinares pancreáticas normales, tales como la síntesis y secreción de enzimas digestivas (Christophe, 1994). Asimismo, la expresión de receptores y los mecanismos de transducción son similares a los de las células acinares pancreáticas (Christophe, 1994; Piiper *et al.*, 2001; Masamune *et al.*, 2001). Por ello, ha sido ampliamente usada como modelo *in vitro* para el estudio de la secreción pancreática exocrina (Elinson *et al.*, 2006; Bose *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2005; De Lisle *et al.*, 2005); señales de transducción (Regimbald-Dumas *et al.*, 2007; Damm *et al.*, 2004); funcionalidad del citoesqueleto (Sato *et al.*, 2005); apoptosis (Voisin *et al.*, 2006; Landau *et al.*, 2006; Gebhardt *et al.*, 2004) y pancreatitis aguda (Yu *et al.*, 2006; Rizvi *et al.*, 2006; Gaiser *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2002; Motoo *et al.*, 2001).

Sin embargo, hay un hecho importante, las células AR42J poseen propiedades exocrinas pero también neuroendocrinas (Rosewicz *et al.*, 1992). Son diferentes de las células acinares normales por varias razones (Christophe, 1994): 1) proliferan rápidamente; 2) sintetizan, almacenan, y secretan enzimas digestivas aunque la regulación de los mecanismos de secreción enzimática es anormal, y 3) poseen una vía de regulación neuroendocrina adicional. Pero este problema se solventa mediante la adición de hormonas polipéptidas y esteroideas, especialmente glucocorticoides, al medio de cultivo, ya que estas células son bastantes susceptibles a estos compuestos. Por esta razón hemos realizado nuestro estudio en células AR42J tratadas con dexametasona (100nM), con el fin de diferenciarlas hacia un fenotipo exocrino similar al de una célula pancreática acinar de rata (Audi *et al.*, 2007).

Este glucocorticoide favorece la diferenciación de las células AR42J hacia un fenotipo exocrino y disminuye la proliferación (Eum *et al.*, 2003). Logsdon y cols. (1985) han descrito que después de 48 h de tratamiento con dexametasona el contenido de amilasa incrementa ocho veces. El aumento de amilasa es perceptible después de 12 h de incubación con dexametasona y la máxima estimulación se produce después de 72 h. También se ha descrito que el tratamiento con dexametasona aumenta la secreción de amilasa estimulada por CCK debido a que los glucocorticoides inducen un aumento del número de receptores de CCK en las células AR42J, lo que conlleva a una mayor sensibilidad a este péptido (Logsdon *et al.*, 1985).

Se ha podido comprobar que este tratamiento produce un incremento en la tasa de síntesis y niveles de RNAm para diversas proteínas de secreción, incluyendo amilasa, tripsinógeno,

quimiotripsinógeno, procarboxipeptidasa y lipasa, que además aparecen incluidas en gránulos de zimógeno. De este modo, si el tratamiento con dexametasona cambia la funcionalidad de estas células en cuanto, por ejemplo, a secreción de amilasa es importante destacar que es difícil comparar nuestros resultados con los de la gran mayoría de los autores que han usado este modelo *in vitro* de pancreatitis aguda con células sin diferenciar. Otro efecto importante y diferencial de la dexametasona es que modifica el perfil lipídico de las membranas. En estudios previos hemos comprobado que el tratamiento de células AR42J con dexametasona produjo un aumento del grado de insaturación, concretamente de PUFA n-6 y una disminución de la saturación (Audi, 2008).

En un principio, además de validar la adaptación del perfil de ácidos grasos de membrana a los ácidos grasos incorporados al medio de cultivo, se discutirá sobre la respuesta inflamatoria y la repercusión funcional en este modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en células AR42J diferenciadas, y el efecto de la presencia de un compuesto fenólico, HT. En segundo lugar, se describirá ese mismo modelo pero en células AR42J diferenciadas con membranas modificadas en su perfil de ácidos grasos por la presencia en el medio de MUFAs o PUFAs n-3, con el fin de evaluar el efecto de la modificación del perfil lipídico, así como la presencia de HT, junto con el estudio de las posibles interacciones o potenciación entre ambos factores. Finalmente, se discutirán, de forma comparativa, los resultados obtenidos en células con membranas enriquecidas en MUFAs y las enriquecidas en PUFAs n-3. En definitiva, pretendemos conocer si la modificación del perfil lipídico y/o la presencia de un antioxidante, afecta a la susceptibilidad de la célula acinar frente a un estímulo nocivo (ceruleína) que conocemos que desencadena en estas células un proceso oxidativo-inflamatorio muy definido.

## **Modificación del Perfil de ácidos grasos de las membranas de las células AR42J**

Para confirmar la validez de este modelo celular de acuerdo a nuestros objetivos, se ha determinado la modificación del perfil de ácidos grasos de membrana al incorporar al medio de cultivo ácido oleico (MUFAs) y EPA+DHA (PUFAS n-3).

En estudios preliminares en nuestro laboratorio hemos comprobado que la adición de ácidos grasos al medio de cultivo (ácido oleico, mayoritario en el aceite de oliva y ácido

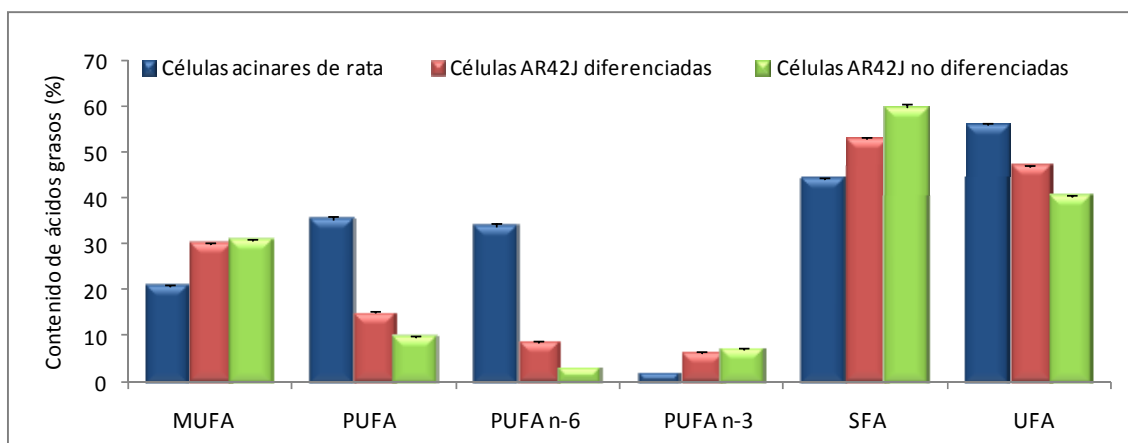
linoleico, mayoritario en el aceite de girasol) da lugar después de solo 72 h a modificaciones lipídicas de la membranas similares a las que obtuvimos en ratas tras ocho semanas de adaptación a dietas ricas en grasas dietéticas con diferentes ácidos grasos mayoritarios en ellos (aceite de oliva, rico en ácido oleico o girasol rico en ácido linoleico); así, este modelo experimental nos va a permitir ahorrar mucho tiempo (días frente a semanas) y dinero, y mejorar la reproducibilidad de los datos (escasa manipulación de células previa a los experimentos y células con viabilidad óptima). Por último, el sacrificio anual de animales de experimentación en las investigaciones biomédicas y las implicaciones éticas que esto conlleva justifica el empleo de líneas celulares en cultivo.

Existen distintas técnicas para modificar el perfil lipídico de las membranas de células en cultivo. Los ácidos grasos libres son tóxicos si no están acomplejados con albumina u otra proteína. El método más usado consiste en preparar un complejo BSA-ácidos grasos que después es agregado al suero (Ding & Mersmann, 2001) o al suero más medio (Mishra y Simonson, 2005). Dado que nuestro protocolo no contempla quitar el suero del medio de cultivo, lo que hemos hecho ha sido acomplejar directamente los ácidos grasos (como ya se explico en material y métodos). Este método es simple y rápido, y no parece producir ningún tipo de alteración en el cultivo (según el método de azul tripán) ya que las células AR42J con o sin ácidos grasos añadidos tienen un patrón similar de crecimiento y grado de diferenciación (Audi *et al.*, 2007).

Con anterioridad, se ha mencionado que la dexametasona modifica el perfil lipídico de las membranas, aumentando la poliinsaturación y disminuyendo la saturación. Además, la dexametasona indujo en las células AR42J (NM) un patrón más cercano al observado en las células acinares de rata. De hecho, en la gráfica de la figura 51 se muestra el perfil de ácidos grasos de las membranas de células acinares de ratas y de las células AR42J sin diferenciar o diferenciadas con dexametasona (Audi, 2008). Si bien las células AR42J no son totalmente semejantes, en cuanto a perfil lipídico de membrana se refiere, sobre todo por el contenido en PUFAs, las células AR42J diferenciadas son más similares a las células acinares de ratas que las células AR42J sin diferenciar.

Teniendo en cuenta que el cambio del perfil lipídico de las membranas puede producir efectos sobre la funcionalidad celular, parece evidente que las células AR42J deban diferenciarse para inducir un fenotipo más exocrino, cuyas características fisiológicas se asemejan más a una célula de páncreas exocrino.





**Figura 51.** Perfil de ácidos grasos de las membranas de células acinares de ratas y de las células AR42J sin diferenciar o diferenciadas con dexametasona Fuente: Audi, 2008.

En estudios realizados en animales, los ácidos grasos de la dieta son fácilmente incorporados a las membranas de las células de varios tejidos, sin embargo, no está claro si todos los tejidos incorporan los ácidos grasos en la misma magnitud (Berlin, 1998). Diversos estudios han demostrado que la composición de la grasa dietética influye en el perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos de membranas celulares y subcelulares de diferentes órganos tales como hígado, músculo, páncreas, etc. (Neelands y Clandinin, 1983; Quiles et al., 1999; Soriguer et al., 2000; Díaz et al., 2003).

En este estudio la incorporación de los ácidos grasos al medio de cultivo introdujo importantes cambios en el perfil lipídico de las membranas de las células acinares pancreáticas AR42J. De la misma forma que otros autores han mostrado en células endoteliales, las células AR42J se enriquecieron de acuerdo al ácido graso específico agregado al medio de cultivo (Couloubaly et al., 2007; Gousset-Dupont et al., 2007). De esta forma, las células enriquecidas con 18:1 n-9 (grupo MO) mostraron un significativo aumento de MUFA (debido a 18:1 n-9) en detrimento de los SFA y de los PUFA n-6, además, en este grupo los UFA aumentaron significativamente, no así el índice de insaturación. Por el contrario, la adición de 20:5 n-3 y 22:6 n-3 al medio de cultivo, en las proporciones descritas (grupo Mn-3), produjo un aumento significativo en los lípidos de membrana, de los PUFA n-3 (debido a 20:5 n-3 y 22:6 n-3) a expensas de una disminución de los MUFA, y aunque la cantidad de UFA en la membrana no fue modificada

significativamente, si hubo un aumento, significativo, del índice de insaturación en este grupo.

Un punto importante a destacar es la facilidad con que C20:5  $\omega$ -3 y C22:6  $\omega$ -3 se incorporan en las membranas de las células AR4-2J, en especial C20:5  $\omega$ 3, ya que en relación a la proporción de EPA/DHA (3:2) añadidos al medio, la membrana se enriquece en mayor proporción en C20:5  $\omega$ -3. Esta especial captación y enriquecimiento de las membranas en C20:5  $\omega$ -3 también ha sido descrita en el tejido pancreático exocrino de ratas alimentadas con una dieta rica en AGPI  $\omega$ -3 (Soriguer *et al.*, 2000), además se ha descrito que al suplementar con AGPI  $\omega$ -3 disminuye significativamente la desaturación de C18:3  $\omega$ -3 y por otro lado, disminuye la concentración de C20:4  $\omega$ -6 en la membrana celular (Dupertuis *et al.*, 2007).

La proporción de SFA del grupo MO fue significativamente menor que en los grupos NM y Mn-3, a diferencia de lo que otros autores han encontrado en modelos *in vivo* en donde la fracción saturada de diversos tejidos es resistente a ser alterada por la dieta (Begin *et al.*, 1990, Quiles *et al.*, 1999, Soriguer *et al.*, 2000). En este estudio no se observó dicha resistencia y de hecho, la menor proporción de SFA que se observó en el grupo MO se debió principalmente a la disminución de C18:00. Si bien es cierto que uno de los factores que las células regulan estrechamente es el grado de saturación de sus membranas (Maxfield *et al.*, 2005), más importancia fisiológica tiene mantener una óptima proporción entre SFA y UFA (1:1), ya que las alteraciones en esta relación produce cambios en la fluidez de la membrana, lo que puede ocasionar importantes efectos sobre su funcionalidad (Thewke *et al.*, 2000). En este aspecto, las células AR42J parecen tener un mayor control sobre la relación SFA/UFA, ya que los tres grupos presentan valores cercanos a 1, y si bien el grupo MO es el que más se acerca a la proporción óptima, al comparar los tres grupos experimentales, este muestra una menor proporción SFA/UFA y por tanto una mayor fluidez de sus membranas. Por otra parte, en el grupo Mn-3 no se observaron cambios significativos en el contenido total de SFA ni de UFA, sí de un aumento en la cantidad total de PUFA. Este aumento de los PUFA se traduce en una mayor presencia de dobles enlaces en la membrana, lo cual podría aumentar la susceptibilidad de esta a ser oxidada (Biondo *et al.*, 2008).

Al igual que en la gran mayoría de las células de mamíferos, los ácidos grasos que se encuentran en mayor proporción en los grupos NM, MO y Mn-3 son: C16:00 y C18:00, los

cuales son los precursores de los UFA que predominan en las membranas celulares: 16:1 n-7 y C18:1 n-9 (Thweke et al., 2000).

Los componentes lipídicos de las membranas biológicas son importantes para el funcionamiento normal de la célula, su inadecuada distribución o metabolismo puede tener consecuencias significativas para la función y comportamiento de la célula. En los humanos, uno de los factores más significativos que afectan la membrana es la ingesta de colesterol y de grasas provenientes de la dieta, sin embargo, las células han desarrollado un mecanismo extraordinariamente sofisticado para controlar la composición lipídica y así mantener las propiedades de las membranas (Maxfield et al., 2005). En este sentido es importante destacar como las membranas de las células del grupo Mn-3 al enriquecerse en PUFA compensatoriamente aumentaron la concentración relativa de los SFA: C12:00, C18:00 y C24:00, manteniendo así la proporción SFA/UFA. Así también, las membranas del grupo MO al enriquecerse en C18:1 n-9, la concentración de PUFA de 20 o más carbonos, principalmente de la serie 6, disminuyeron.

Es importante destacar que la modificación del perfil lipídico de las células AR42J no ha sido demostrada con anterioridad por otros grupos de investigación, menos aún se conoce cómo el enriquecimiento de las membranas de células diferenciadas AR42J con diferentes ácidos grasos afecta a la función celular en un modelo *in vitro* de pancreatitis aguda.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la línea celular utilizada responde de forma eficiente modificando el perfil lipídico de sus membranas y por ello, podemos considerar que el modelo es, en este aspecto, adecuado para estudiar si los efectos beneficiosos de ciertos tipos de ácidos grasos de la dieta, en animales de experimentación, sobre los acontecimientos tempranos que se producen a nivel intraacinar en este modelo celular de pancreatitis aguda por hiperestimulación con ceruleína, se deben a su incorporación a las membranas celulares, **lo que constituye uno los objetivos primordiales de esta tesis.**

## Modelo de Pancreatitis Aguda en células AR42J diferenciadas

### *Efecto de la ceruleina*

#### *Respuesta inflamatoria*

La pancreatitis aguda es una enfermedad inflamatoria cuya patogénesis no es aún bien conocida. No obstante, son varios los estudios que demuestran que las propias células acinares pueden actuar como fuente de citocinas y mediadores inflamatorios en respuesta al daño celular que se produce en etapas temprana de la enfermedad, desencadenando una reacción inflamatoria local, y modificando por tanto el curso de la enfermedad (Bhatia et al., 2005; Ramudo et al 2005).

Por este motivo, resulta interesante el estudio de la producción de citocinas inflamatorias y activación de factores de transcripción, como el NF-kB, involucrados en el proceso inflamatorio que cursa en un modelo *in vitro* de pancreatitis inducida por ceruleina.

#### Activación del NF-kB

La posición central que ocupa la respuesta inflamatoria en el desarrollo de la pancreatitis, y el papel clave del NF-kB como regulador de la expresión de moléculas inflamatorias implicadas en dicha enfermedad es cada vez más reconocido (Vaquero et al., 2001; Gukovsky et al., 1998).

El NF-kB es uno de los varios sistemas de señalización que median la producción de citocinas proinflamatorias, quimocinas, receptores inmunes y otras moléculas inflamatorias que inician las graves complicaciones sistémicas inflamatorias de la pancreatitis (Vaquero et al., 2001). Este factor de transcripción pertenece a la familia de proteínas Rel, encargadas de la regulación transcripcional y compuesta por 5 miembros: p50, p52, p65, Rel B y c-Rel (Sen and Baltimore, 1986). Una característica de estos miembros es la necesidad de crear dímeros entre ellos para poder unirse al DNA. De modo que en células no estimuladas, el NFkB se encuentra silenciado en el citoplasma mediante la asociación con una familia de

proteínas inhibidoras conocidas como IκB, que engloba a IκBα, IκBβ, IκBe e IκBγ (Ghosh and Karin, 2002; Silverman and Maniatis, 2001).

El complejo IκBα-p50-65 en condiciones normales se encuentra en el citoplasma hasta que un amplio rango de estímulos, como citocinas o ERO, activan esta vía de transcripción mediante la fosforilación de las proteínas IκB a través de las cinasas IκB (IKKs) (Granger and Remick, 2005; Long et al., 2005). Esta fosforilación provoca la unión de las proteínas IκB con un complejo que las poliubiquitina y las marca para que el proteosoma las degrade. De este modo el NF-κB queda libre, se trasloca al núcleo y se une al ADN (Karin and Ben-Neriah, 2000). Por este motivo, en nuestro estudio analizamos la activación de dicho factor mediante la determinación de la concentración citosólica de IκBα y los niveles nucleares de p65.

Respecto a la activación del NF-κB por ceruleína, Satoh y colaboradores (2004) mostraron que está regulada por la PKC, en concreto las isoformas PKCε y PKCδ, las cuales inician una cascada de fosforilación que finaliza con la degradación de las proteínas IκBα, y la activación del factor de transcripción. De modo que al unirse la ceruleína a sus receptores presentes en la membrana de la célula acinar, se produce una cascada de señalización que comienza con la activación de la PLC, y sigue con la hidrólisis del IP<sub>2</sub>, y consiguiente activación de PKC por medio del DAG. Asimismo, se ha demostrado que la activación del NF-κB es dependiente de Ca<sup>2+</sup>, concretamente, de la elevada concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico que se produce en la célula acinar tras la estimulación supramáxima con ceruleína (Criddle et al., 2007). En nuestro caso, el tratamiento con ceruleína 10<sup>-8</sup> M produjo una significativa disminución en la concentración citosólica de IκBα (figura 21 A) junto con un aumento, también significativo, en los niveles nucleares de p65 (figura 23 A), lo que nos sugiere que dicha activación podría estar mediada por la degradación de la proteína IκBα, probablemente por la vía antes comentada.

No obstante, las vías involucradas en la activación de dicho factor pueden ser varias. Estudios llevados a cabo en células AR42J no diferenciadas, relacionan el aumento de ERO producido por la estimulación con ceruleína 10<sup>-8</sup> M, con la activación del NF-κB, ya que observan una inhibición de la activación tras el uso de antioxidantes (Yu et al., 2005; Yu et al., 2002). Asimismo, Camandola y colaboradores (1996) muestran una activación del NF-κB tanto por un efecto directo del AA, como por un efecto de la PGE<sub>2</sub>, en promonocitos humanos.

En resumen, observamos que la estimulación supramáxima con ceruleína produce una activación del NF- $\kappa$ B en células AR42J diferenciadas, al igual que lo observado por otros autores en estudios *in vivo*, llevados a cabo en rata, e *in vitro*, en acinos pancreáticos de rata y células AR42J no diferenciadas (Han et al., 2000; Chan et al., 2011; Yu et al., 2002). Por lo que podemos decir que al igual que ocurre en otros modelos de pancreatitis inducida por ceruleína, nuestro modelo también cursa con una activación de dicho factor de transcripción.

### Producción de mediadores inflamatorios (IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ )

Varios modelos experimentales de pancreatitis, tanto *in vivo* como *in vitro*, en suspensión de acinos y en cultivos de células AR42J, han puesto de manifiesto el papel primordial que tienen los factores inflamatorios en el proceso de pancreatitis (Lee et al., 2003; Ramudo et al., 2005; Yu et al., 2005), siendo capaces de incrementar el daño tanto por mecanismos inflamatorios como apoptóticos, como es el caso del TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  (Bhatia et al., 2005).

Entre las células inflamatorias reclutadas dentro del páncreas durante un episodio de pancreatitis, se vio que las propias células acinares podían actuar como una fuente de citocinas y modificar el curso de la pancreatitis (Saluja et al., 2007). Por este motivo se determinó la producción de citocinas inflamatorias, con el fin de determinar la respuesta inflamatoria de las células AR42J diferenciadas ante la presencia de un agente nocivo como es la ceruleína.

En principio, cabe destacar las concentraciones tan bajas de citocinas inflamatorias, que encontramos en el medio, en comparación con los resultados obtenidos por otros autores en esta línea celular sin diferenciar. De hecho, los niveles de TNF $\alpha$  fueron tan bajos que a pesar de tratarse de una técnica extremadamente sensible, no se pudieron cuantificar. De este modo, Yu y colaboradores (2006) muestran concentraciones de IL-1 $\beta$  en torno a 15 pg/ml, en células AR42J sin ceruleína, y más de 100 pg/ml tras ser incubadas 24 h con ceruleína  $10^{-8}$  M. Sin embargo, en nuestro caso la IL-1 $\beta$  no muestra concentraciones superiores a 1 pg/ml en ninguno de los grupos experimentales. En el caso de la IL-6, sus concentraciones en el medio fueron de 4.95 pg/ml en el grupo NM y 8.88 pg/ml en el grupo CeNM (tabla 15), mientras que Yu y colaboradores (2007) presentan valores por encima de 25 pg/ml en esta línea celular sin ceruleína, y por encima de 75 pg/ml tras ser

incubadas 24 h con ceruleína  $10^{-8}$  M. Esto, podría deberse al hecho de que en nuestro caso incubamos las células AR42J durante 72 h con dexametasona (100nM), DX, como se comentó anteriormente, con el fin de diferenciarlas hacia un fenotipo exocrino similar al de una célula pancreática acinar de rata como comenábamos al principio de la discusión (Audi et al., 2007). La DX es un glucocorticoide sintético, y como tal, es un agente antiinflamatorio e inmunosupresor que actúa sobre el sistema inmune mediante la supresión de la síntesis de un gran número de mediadores proinflamatorios y sobre la regulación de citocinas proinflamatorias (Nakagawa et al., 1999; Galon et al., 2002). De hecho, se ha demostrado que la DX reduce la expresión de quimocinas y citocinas en células acinares pancreáticas de rata (Yubero et al., 2009). Además, estudios llevados a cabo tanto en animales como en humanos con pancreatitis aguda, han mostrado una disminución en los niveles de citocinas en suero tras el tratamiento con glucocorticoides (Wang et al., 2003; Farkas et al., 2006).

Aunque la incubación con DX fue anterior a la inducción de la pancreatitis con ceruleína  $10^{-8}$  M, e incluso pasadas las 72 h se eliminó del medio y se sustituyó por medio fresco, es posible que debido a su mecanismo de acción, a nivel transcripcional, estos efectos permanezcan en la célula una vez eliminada del medio. De hecho, se ha demostrado un efecto profiláctico de dicho compuesto, además del terapéutico (Ramudo et al., 2010).

No obstante, cabe destacar que aunque la producción de dichos intermediarios inflamatorios se pueda encontrar disminuida, la respuesta inflamatoria ante la ceruleína es similar a la encontrada en otros modelos, aumentando los valores de IL-6 en el medio del grupo CeNM (tabla 15). A pesar de un posible efecto antiinflamatorio de la DX en nuestro modelo, es importante el hecho de diferenciar las células AR42J ya que si estamos estudiando un modelo de célula acinar pancreática exocrina, es necesario que dicho modelo *in vitro* sea lo más semejante posible al observado *in vivo*. De hecho, al comparar por microscopía electrónica de transmisión (TEM), una célula AR42J típica, cultivada en un medio intacto sin modificar, y otra cultivada durante 72 horas en presencia de dexametasona 100 nM, se ve como en las células tratadas, los gránulos de zimógeno son mucho más prominentes tanto en número como en tamaño, y se aprecia un incremento en la cantidad de RER, que se muestra como grandes cisternas apiladas. Con esto se demuestra una inducción hacia un fenotipo exocrino similar al de una célula pancreática acinar de rata, por parte de la dexametasona (Audi et al., 2007). Pero estos cambios no solo son morfológicos. Las células diferenciadas con dexametasona presentan una inhibición del

75% de la replicación celular, muestran mayor número de receptores para la CCK, y experimentan un aumento en la síntesis de proteínas secretoras entre 5 y 10 veces mayor, especialmente en la síntesis de amilasa (Swarovsky et al., 1988; Wank et al., 1992). Además, puesto que todos los grupos fueron diferenciados con DX, es posible llevar a cabo comparaciones entre los diferentes grupos experimentales. Por todo, parece justificado el uso de dicho glucocorticoide.

Dentro de las citocinas que intervienen en la respuesta inflamatoria de la enfermedad, la IL-6 se produce en la fase aguda de la pancreatitis y se secreta al suero para inducir la respuesta inflamatoria mediante la unión a sus receptores alpha. Se le considera una citocina proinflamatoria y se ha consolidado como un indicador del nivel de gravedad de la pancreatitis aguda (Leser et al., 1991). Pero no solo se le considera un marcador de gravedad sino que también se le relaciona como la causa directa del daño pancreático. Asimismo, se ha visto que en ratones transgénicos, la sobreexpresión de IL-6 los hizo más propensos a la pancreatitis aguda (Suzuki et al., 2000b). Nuestros resultados revelaron un aumento en la producción de IL-6, en células AR42J diferenciadas al ser tratadas con ceruleina  $10^{-8}$  M durante 24 h. Este efecto que ejerce la ceruleina en la secreción de IL-6, es el mismo que el observado por otros autores, tanto en modelos *in vivo* (Melo et al., 2011), como *in vitro* con células AR42J sin diferenciar (Yu et al., 2007; Ju et al., 2011). Este aumento en la secreción de IL-6 se relaciona con la mayor activación de NF-kB que presenta el grupo CeNM.

Respecto a la IL-10, es una potente citocina anti-inflamatoria. La vía de señalización de la IL-10 comienza con la interacción con su receptor y la posterior inducción de la activación de las proteínas JAKs que a su vez activan los factores de transcripción STAT1, -3 y -5, mediante su fosforilación, y se traslocan al núcleo de donde activarán la expresión de varios genes (Leonard and O'Shea, 1998), la mayoría relacionados con la supresión de las vías de señalización de las citocinas proinflamatorias. La IL-10 también interfiere con el NF-kB, en células AR42J, bloqueando su translocación al núcleo (Wang et al., 1995) y su posterior unión al DNA (Driessler et al., 2004). Se piensa que esta interleucina tiene un papel protector en la pancreatitis aguda (Rongione et al., 1997). En nuestro modelo, la producción de IL-10, disminuyó ligeramente en el grupo CeNM (tabla 15), lo cual no es de extrañar, ya que dicho descenso se ha observado en pancreatitis inducida por ceruleina en un modelo *in vivo* (Carvalho et al., 2010).



Numerosos estudios ponen de manifiesto que el resultado de la pancreatitis depende del balance entre los niveles de citocinas pro y antiinflamatorias (Norman et al., 1998; Dignam et al., 1983). De hecho, se relaciona inversamente el valor del índice IL-10/IL-6 con la gravedad de la enfermedad (Ohmoto et al., 2005). La menor producción de IL-10 tras el tratamiento con ceruleína, junto con una mayor secreción de IL-6 en el grupo CeNM resulta en un menor valor del índice IL-10/IL-6, lo que sugiere un desequilibrio en la producción de citocinas anti/proinflamatorias producido por la ceruleína, conduciendo a un mayor daño celular, ya que la IL-6, en un modelo in vivo, se relaciona con la activación de macrófagos, diferenciación de células B y la activación de las T y reclutamiento leucocitario entre otros (Hoene and Weigert, 2008), contribuyendo por tanto al desarrollo de la inflamación sistémica que tienen lugar en la pancreatitis aguda. Además, una de las principales vías de señalización activadas por IL-6 es la cascada de MAPK (proteína cinasa activadas por mitógenos), destacándose la activación de los miembros de esta familia relacionados con el estrés celular como p38 (Heinrich et al 2003). Existe, por tanto, una interacción entre la producción de IL-6 y la muerte celular por apoptosis.

### *Mecanismos de muerte celular*

#### Apoptosis/Necrosis

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico que se encarga de mantener la homeostasis de los tejidos. Debe de existir un equilibrio entre la apoptosis y proliferación celular, de manera que la desregulación de estos procesos desencadena enfermedades muy diferentes, como el cáncer o el Alzheimer, entre otras. En el caso de la pancreatitis aguda, la gravedad de la enfermedad está directamente relacionada con el grado de necrosis e inversamente con el grado de apoptosis (Bhatia, 2004; Mareninova et al., 2006).

El ensayo de apoptosis/necrosis, mediante la determinación con anexina V e yoduro de propidio por citometría de flujo, mostró que un 73,84% de células AR42J diferenciadas estaban vivas. El resto de células corresponden, un 1,74% a muerte por apoptosis, y el 24,42% restante a necrosis (figura 31). Debido a la falta de bibliografía en este tipo de células diferenciadas respecto a los mecanismos de muerte celular, resulta difícil elucidar la

causa de este porcentaje de muerte celular. Podría deberse a que su capacidad proliferativa es mínima y tienden a entrar en senescencia en un determinado periodo de tiempo.

Nuestros resultados muestran un porcentaje de muerte por necrosis superior al de apoptosis en el grupo NM. Mientras que la apoptosis es un proceso altamente coordinado y mediado generalmente por factores intrínsecos, aunque también pueden contribuir mecanismos extrínsecos (Johnstone et al., 2002), los factores que contribuyen a la necrosis son mayoritariamente de naturaleza extrínseca, tales como osmolaridad y toxicidad (Bhatia et al., 2004). Estas señales tóxicas o de muerte celular, a través de mecanismos comunes, pueden causar apoptosis o necrosis, dependiendo de ciertas variables entre las que se encuentra el suministro de ATP (Kim et al., 2003). En nuestro caso, la necrosis podría deberse a varios motivos, entre ellos, a causa de un fuerte estrés celular por una generación excesiva de ERO que se asocia con un colapso del potencial de membrana mitocondrial (con apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial), inhibición de la producción de ATP, inhibición de caspasas y muerte por necrosis (Mukherjee et al., 2008; Odínokova et al., 2008). Existen estudios que demuestran que la existencia de daños en el ADN también podría desencadenar la muerte celular por necrosis, a través de la activación de las proteínas PARP, encargadas de reparar el ADN. La activación de estas proteínas produce una disminución en el nicotin adenin dinucleotido (NAD) citoplasmático y nuclear, provocando a su vez, una inhibición de la glucólisis, por lo que los niveles de ATP celular disminuyen drásticamente, finalizando en muerte celular por necrosis (Edinger et al., 2004). En nuestro caso, los resultados obtenidos en presencia de HT, como se comentará en el apartado siguiente, sugieren que se debe a un daño oxidativo, sin descartar otras posibilidades.

El tratamiento con ceruleína, tanto  $10^{-8}$  M como  $10^{-7}$  M, produjo una disminución en el número de células (figura 32 A) y un aumento de apoptosis (figura 33 A). Este efecto ha sido observado por otros autores. Así, Yu y colaboradores (2005) observaron que la ceruleína aumenta la producción de ERO en las células AR42J, y que esa producción de ERO en el curso de la pancreatitis puede estar mediada por NADPH oxidasa de manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , induciendo apoptosis mediante la expresión de genes apoptóticos como p53 y Bax, y aumento en la actividad de la caspasa-3. La apoptosis producida por ceruleína puede estar mediada tanto por vía intrínseca mitocondrial, cursando con la liberación del citocromo c y activación de la caspasa-9 que a su vez activa a la caspasa-3, proceso mediado por las proteínas canales Bax/Bak (Mareninova et al., 2006), como a

través de una vía alternativa Mdm2/p53/caspasa 2 independiente de la mitocondria (Nakamura et al., 2010). A su vez, la ceruleina también estimula la actividad del p38, el cual puede ser activado por citocinas proinflamatorias como se ha comentado anteriormente, relacionado con la activación de la apoptosis (Chen et al., 2010). De hecho, citocinas como el TNF- $\alpha$  e interleucinas, pueden inducir necrosis celular, contribuyendo al daño pancreático local (Büchler et al., 2000).

Los grupos Ce-7NM y Ce-8NM mostraron menor necrosis que el grupo NM (figura 34 A), esto podría deberse a la activación de caspasas inducidas por la ceruleina, ya que se ha observado que la activación de las caspasas no solo media la apoptosis, sino que protegen frente a la necrosis (Mareninova et al., 2006). El tipo de muerte celular es un factor determinante en la amplificación del proceso inflamatorio en la pancreatitis aguda. La necrosis, con ruptura de la membrana plasmática y vertido de enzimas pancreáticas activas y otros componentes celulares al exterior se asocia a un componente inflamatorio mucho mayor que la apoptosis, en donde la integridad de la membrana plasmática se mantiene a la vez que la célula deja de secretar citocinas y quimocinas (Bhatia, 2004; Mareninova et al., 2006). Esto explicaría la correlación inversa entre la relación apoptosis/necrosis y la gravedad de la enfermedad observada en los modelos experimentales de pancreatitis. De hecho, estos mecanismos de señalización pueden tener un papel importante en el daño y muerte de la célula acinar en la pancreatitis. De hecho, se ha postulado en un modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleina, que la presencia de neutrófilos disminuye la apoptosis en las células acinares a través de la inhibición de p53, por lo que se contempla como tratamiento de la pancreatitis la inhibición de Mdm2 y/o regulación a la alza de p53 (Nakamura et al., 2010).

## MTT

El ensayo de MTT determina el posible efecto citotóxico de una sustancia sobre la viabilidad celular. La citotoxicidad describe la capacidad de cualquier sustancia o mediador celular para destruir las células vivas, independientemente del mecanismo por el que se le induzca la muerte. Concretamente con este ensayo se determina viabilidad celular mediante la evaluación de la actividad metabólica de las mitocondrias, ya que se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a través de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul

(formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas se expresa como porcentaje de viabilidad, que es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Al igual que lo observado por otros autores en este tipo de células sin diferenciar (Kazanjian et al., 2003; Yu et al 2005), nuestros resultados revelaron una significativa disminución de la viabilidad, aproximadamente del 25%, en los grupos de células AR42J diferenciadas y tratadas con ceruleína, tanto a la concentración  $10^{-8}$  M como  $10^{-7}$  M (figura 38). Probablemente esta evaluación mitocondrial sea una indicación temprana del daño celular, de modo que estos resultados junto con la disminución en el número de células vivas y el aumento de apoptosis en los grupos Ce-8NM y Ce-7NM que se obtuvo en el ensayo de apoptosis/necrosis, podrían indicar una implicación de la mitocondria en ese aumento de apoptosis tras el tratamiento con ceruleína. Con esto se intuye que la ceruleína está ejerciendo un daño celular alterando la funcionalidad mitocondrial, lo que se expresa con esa disminución de la viabilidad y mayor muerte celular por apoptosis.

### *Funcionalidad celular*

#### Concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_c$ )

Como se comentó al principio, de entre los diferentes modelos experimentales de pancreatitis aguda que se utilizan en las distintas especies, es el modelo de estimulación supramáxima con secretagogo uno de los más conocidos. En este modelo, el animal recibe una dosis suprafisiológica del secretagogo CCK o de su análogo ceruleína, lo que induce la aparición de un proceso que muestra grandes similitudes bioquímicas, morfológicas y fisiopatológicas con la pancreatitis humana (Saluja et al., 2007). Actualmente existen gran consenso en el concepto de que los eventos que culminan en pancreatitis se inician en la célula acinar, por lo que la hiperestimulación de acinos frescos o incluso líneas celulares en cultivo continuo, como es nuestro caso, se consideran un modelo válido para investigar la patogénesis de la pancreatitis en lo que se refiere a sus aspectos más tempranos.

De entre los acontecimientos intracelulares más relevantes que suceden en este modelo de pancreatitis aguda, y que llevan al daño en la célula acinar, se encuentran un bloqueo de la secreción y el aumento patológico en las concentraciones de calcio citosólico, además de la generación de especies reactivas de oxígeno entre otros, cómo se vio en el apartado de

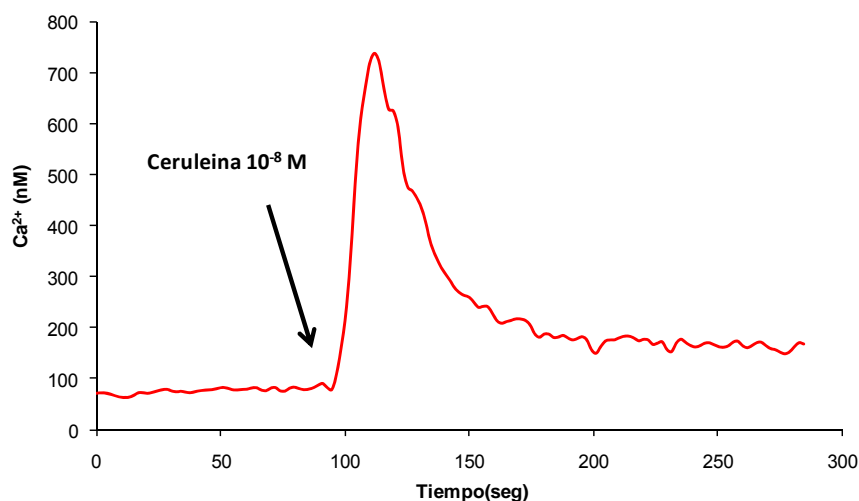
antecedentes. La mayoría de las investigaciones se centran en el estudio de estos incrementos patológicos en las  $[Ca^{2+}]_c$  y su relación con muchos de los procesos de daño que tienen lugar en la célula acinar. Pues bien, cabe destacar que en nuestro caso, la determinación de la  $[Ca^{2+}]_c$  junto con el estudio de la secreción de amilasa, se analizan como pruebas de la función celular, con el fin de evaluar la respuesta al secretagogo CCK-8 en células AR42J diferenciadas, dañadas previamente con ceruleína. Es decir, las células se incubaron con ceruleína  $10^{-8}$  M durante 24 h, y transcurrido este tiempo se le evaluó la capacidad secretora en respuesta a un secretagogo.

Nos gustaría destacar que es importante el estudio de dicho ión, ya que se trata de un mensajero intracelular que controla un amplio abanico de procesos celulares, entre los que se incluyen la contracción, la secreción, la transcripción génica y el crecimiento celular. De hecho, se ha demostrado que la alteración de los mecanismos homeostáticos responsables de la regulación del  $Ca^{2+}$  celular, puede causar la muerte celular, bien de un modo desordenado mediante necrosis, o por un mecanismo más controlado, mediante apoptosis (Pariente et al., 2003).

En primer lugar, si observamos la curva de respuesta al secretagogo CCK-8 en células AR42J diferenciadas no tratadas con ceruleína, se puede ver que los niveles basales de  $Ca^{2+}$  citosólico en estas células, aunque se encuentran ligeramente por debajo de los valores obtenidos por otros autores en este tipo de células sin diferenciar (150 nM), son similares a los obtenidos en acinos pancreáticas de ratas alimentadas con un pienso comercial ( $113.7 \pm 31.5$  nM,  $n=6$  y  $115.9 \pm 82$  nM,  $n=21$ , respectivamente) (Yago et al., 2006; Muallem et al., 1995). Estos datos podrían validar nuestro modelo celular, acercándose los valores encontrados en nuestro modelo a los valores basales de células acinares pancreáticas de rata. Un vez que se produce el estímulo con CCK-8  $10^{-9}$  M se observa la típica respuesta de  $Ca^{2+}$  a secretagogo en células acinares en suspensión, consistente en un rápido y marcado incremento seguido de un lento y progresivo descenso hasta estabilizarse en un nivel ligeramente por encima del basal. El rápido incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$  al añadir el secretagogo a la suspensión celular (IP) está generado principalmente por la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los almacenes intracelulares y es independiente de la presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular. Cada pico activa las bombas de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática, localizadas principalmente en la zona apical, lo que inicia una salida de  $Ca^{2+}$  citosólico hacia el exterior, por lo que la curva se convierte en dependiente de  $Ca^{2+}$  extracelular, favoreciendo el llenado de los almacenes intracelulares. Esto, junto con otros mecanismos intracelulares,

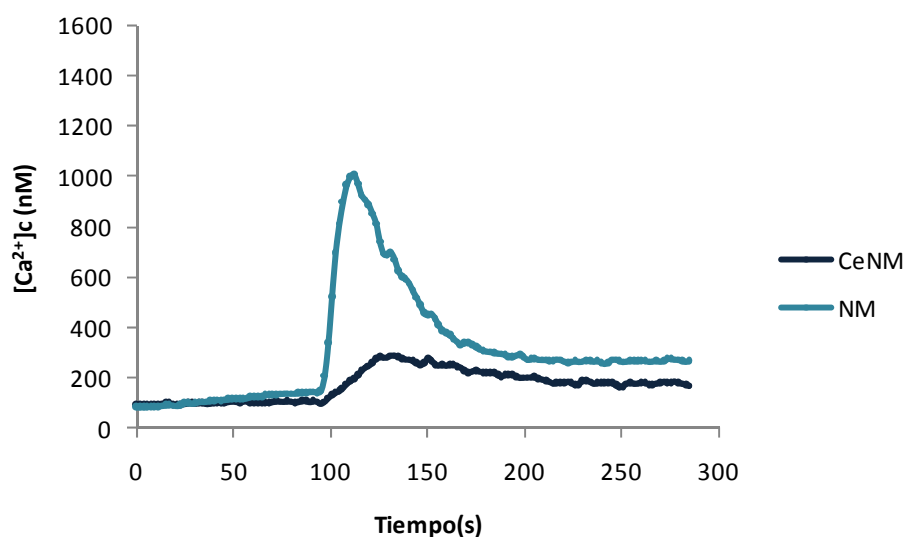
darían lugar a ese descenso prolongado de la segunda parte de la curva (Petersen et al., 2009). No obstante, el IP en nuestras células sanas es superior a lo observado en células acinares pancreáticas de rata en respuesta a CCK-8  $10^{-9}$  M.

La respuesta frente a CCK-8 en células AR42J diferenciadas tratadas con ceruleína  $10^{-8}$  M, está marcadamente disminuida (figura 53). Debido a la falta de bibliografía respecto a la respuesta funcional de  $Ca^{2+}$  a CCK-8 en células AR42J dañadas con ceruleína, el modelo más similar sería el de rata con pancreatitis aguda. A diferencia de lo descrito en estos animales (Mooren et al., 2003), la  $[Ca^{2+}]_c$  basal es similar tanto en las células no tratadas como tratadas (figura 42 A). Esto nos podría indicar que a pesar de haber inducido un daño con ceruleína, la cual produjo en su momento una elevación de  $[Ca^{2+}]_c$ , 24 h después la célula habría sido capaz de devolver dicha concentración a los valores basales de una célula sin tratar. Esa elevación de  $Ca^{2+}$  citosólico producida por la estimulación supramáxima con ceruleína  $10^{-8}$  M, considerada en la bibliografía como una de las señales de disparo relacionada con el daño intracelular (Saluja et al., 2007; Petersen 2009), también la hemos podido observar en nuestras células diferenciadas (figura 52), que forman parte de resultados aun no publicados del proyecto de investigación Ref. AGL2006-05005/ALI.



**Figura 52.** Evolución en el tiempo de los cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico inducidos por ceruleína ( $10^{-8}$  M) en células AR42J diferenciadas con dexametasona (100 nM). La flecha indica el momento de adición de la ceruleína a la suspensión celular.

El hecho de que la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  a CCK-8 en el grupo CeNM, se encuentra fuertemente disminuida lo podemos comprobar en base a varios parámetros de la curva. Por un lado, el IP no solamente aparece fuertemente disminuido en relación a NM ( $P=0.000$ ), sino que se intuye una disminución en la pendiente de subida de este pico en las células CeNM (figura 53). Por otro lado, además de que el ABC es significativamente menor en las células tratadas, la relación IP/ABC también es significativamente menor (figura 44 A y 45 A).



**Figura 53.** Curvas de evolución temporal de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ), en respuesta a CCK-8 ( $10^{-9}$  M), en células AR42J diferenciadas con dexametasona (100 nM), tratadas con ceruleína ( $10^{-8}$  M) durante 24 horas (CeNM; línea oscura), y sin tratar (NM; línea clara). Los valores están expresados como valores medios ( $n=6$  en cada grupo, y pertenecientes al menos de tres lotes diferentes de células).

Los resultados obtenidos del IP nos indicarían que la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares se podría encontrar alterada. Pero no solo se libera menos cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  sino que además, lo podría estar liberando más lentamente (menor pendiente). Asimismo, Ward y colaboradores (1996), muestran una alteración progresiva de los patrones fisiológicos de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en células acinares pancreáticas de ratón, especialmente en el polo secretor, en una pancreatitis aguda inducida por ceruleína, y sugieren una contribución importante de esta alteración, en los trastornos de secreción exocrina que cursan en la enfermedad. De igual modo, Morisset y colaboradores (1987) en un estudio llevado a cabo en ratas con un modelo de pancreatitis inducida por ceruleína, observaron

que la célula acinar permanece funcional tras el daño con ceruleína pero con una reducción importante tanto en potencia como en efectividad frente a la estimulación con carbamilcolina. Estos autores no observaron una pérdida en la afinidad de los receptores de Ach, sino una menor concentración de estos receptores muscarínicos.

Los resultados descritos por otros autores, junto con los nuestros, podrían indicar que la estimulación supramáxima con ceruleína ha producido un daño funcional en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en respuesta a CCK-8 que podría deberse a una alteración en la vía de señalización de las células AR42J diferenciadas, y/o a la presencia de un menor número de receptores CCK de membrana.

Respecto a la disminución del valor del índice IP/ABC en las células enfermas, nos indica que la elevación de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  se encuentra más sostenida en el tiempo. Muchos procesos de daño en la célula acinar son dependientes de estas elevaciones sostenidas, entre ellos la formación de vacuolas endocíticas, y la activación del NF- $\kappa$ B y subsiguiente expresión de citocinas proinflamatorias (Han y Logsdon, 2000; Raraty et al., 2000; Petersen et al., 2009). Aunque en nuestro caso no podemos determinar si la elevación es globalizada, sí es más mantenida en células CeNM, lo que podría contribuir a una amplificación del daño.

El origen de los aumentos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en la pancreatitis aguda es la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares así como su entrada desde el exterior. Los mecanismos responsables de mantener la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  de reposo son los encargados de rellenar los almacenes intracelulares (SERCA) y la salida a través de la membrana plasmática (PMCA), ambas bombas dependientes de ATP. La disminución que observamos en el índice IP/ABC en el grupo CeNM podría deberse a una alteración en el suministro de ATP por parte de la mitocondria, en la cual según los resultados de MTT existen un disfunción (figura 38 A). De modo que el incremento patológico de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que produjo la ceruleína en un principio, podría haber causado alteraciones en la mitocondria desarrollando un proceso apoptótico, el cual hemos descrito anteriormente (figura 38 A), pudiendo comprometer la producción de ATP y por consiguiente, el funcionamiento de las bombas ATPasas SERCA y PMCA. El hecho de que pasadas 24 h de la inducción de la pancreatitis, los valores basales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en células tratadas con ceruleína  $10^{-8}$  M sean semejantes a las no tratadas, y que el índice IP/ABC sea menor en las primeras, nos podría estar indicando que dichas bombas siguen funcionales pero con una menor eficacia, necesitando más tiempo para restaurar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico de reposo.



## Amilasa

### Secreción basal de amilasa

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 en células acinares aisladas son del 4-5% (Yago et al., 2006) del contenido total de la enzima. En las células AR42J no diferenciadas 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 produjo 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 (Audi, 2008).

En nuestras condiciones experimentales, la secreción basal de amilasa en las células AR42J diferenciadas ( $17,53 \pm 0,52$ ) fue superior a la encontrada en células acinares pancreáticas de ratas alimentadas con un pienso estándar la cual fue 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 y cols. (2005) que en células AR42J tratadas con dexametasona encontraron una secreción basal de amilasa más alta que la descrita para células acinares pancreáticas de rata. Otros autores, como Huang y cols. (2002) también han encontrado valores de secreción basal de amilasa superiores a los descritos para células acinares pancreáticas de rata y además, han mostrado una reducción de la secreción basal de células AR42J tras el tratamiento con dexametasona. Esto indica un efecto del proceso de maduración de las vías secretoras sobre la secreción basal de amilasa. La dexametasona no solo induce la 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).

En modelos de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en ratas, la secreción basal de amilasa de los acinos pancreáticos aumenta considerablemente en comparación a su control (Okada *et al.*, 1998). Este aumento es mucho más marcado aún, si la determinación de la amilasa se realiza *in vivo* (Czakó *et al.*, 1997) o en el plasma (Ozkan *et al.*, 2010). Estos hallazgos no concuerdan con nuestros resultados, la ceruleína ( $10^{-8}$  M) disminuye

significativamente la secreción basal de amilasa. Sin embargo, hay que considerar que la ceruleína estuvo presente en el medio de cultivo de las células AR42J diferenciadas durante 24 h y tras este tiempo se determinó la secreción basal de amilasa media después 50 min de incubación.

Los resultados de secreción basal de amilasa obtenidos en pancreatitis aguda inducida por ceruleína en ratas son determinadas en general después de 4 o 6 h (Okada *et al.*, 1998; Özkan *et al.*, 2010). Probablemente, las diferencias encontradas pueden atribuirse a un efecto temporal. Yu y cols. (2002) trataron con ceruleína ( $10^{-8}$  M) células AR42J no diferenciadas y midieron la secreción de amilasa en el medio a las 2, 4, 6, 8 y 16 h. Los niveles de secreción de amilasa aumentaron exponencialmente hasta las 8 h y luego se produjo un efecto *plateau*. Posiblemente, a las 24 h se produzca una disminución de la secreción de amilasa y por ese motivo quizás, se encuentren niveles más bajos de secreción que las células no tratadas con ceruleína (grupo NM). Sin embargo, no existen trabajos que hayan determinado la secreción basal de amilasa bajo las mismas condiciones que nos permitan avalar este hecho. Por otra parte, de la misma forma en que no observamos un aumento de la secreción basal de amilasa con ceruleína, tampoco observamos un aumento de la concentración basal de  $Ca^{2+}$  intracelular.

### **Secreción neta de amilasa estimulada por CCK**

La CCK-8 es un agonista fisiológico que activa varias funciones celulares incluida la síntesis de enzimas digestivas y su secreción. Se sabe que la estimulación con CCK-8 en células acinares pancreáticas produjo una curva dosis-respuesta de secreción de amilasa, alcanzando la máxima secreción a una concentración de CCK-8 de  $10^{-10}$  M, mientras que a concentraciones mayores se produjo un bloqueo de la secreción (Saluja *et al.*, 2007).

Las células AR42J diferenciadas y no diferenciadas muestran una curva dosis-respuesta típica (Audi, 2008; Mikkat *et al.*, 2001). Al comparar la respuesta de las células diferenciadas con las no diferenciadas, Audi (2008) observó que la secreción neta de amilasa estimulada por CCK-8 expresada como porcentaje del contenido total fue similar en ambos casos. Sin embargo, la secreción absoluta de amilasa en células AR42J diferenciadas con dexametasona fue significativamente superior frente a una misma dosis de CCK-8. Estos resultados coinciden con los de otros autores (Huang *et al.*, 2002; De lisle *et al.*, 2005) que observaron un porcentaje de secreción de amilasa respecto al contenido total, similar para células diferenciadas y no diferenciadas con dexametasona. Aunque, en las células

diferenciadas la secreción total de amilasa fue significativamente mayor, debido a que la dexametasona aumentó 5 veces el contenido de esta enzima (Huang *et al.*, 2002).

Estos resultados concuerdan con los descritos por Logsdon y cols. (1985; 1986; 1987), que observaron un incremento de la secreción total de amilasa inducida por CCK- 8 en células AR42J diferenciadas con dexametasona frente a las no diferenciadas. Estos autores atribuyen este hecho al aumento que la dexametasona produce tanto en la síntesis y contenido de amilasa, como en el número de receptores para CCK-8 que aumentan la sensibilidad a CCK-8.

En nuestras condiciones experimentales observamos que al ir aumentando la dosis de CCK-8, la secreción neta de amilasa de las células AR42J diferenciadas (NM) aumentó hasta alcanzar una secreción máxima a una concentración de CCK-8 de  $10^{-9}$  M. A partir de este punto, concentraciones mayores produjeron un *plateau*. Aunque, concentraciones de CCK-8  $>10^{-9}$  M disminuyeron levemente la secreción neta de amilasa, estas no fueron significativamente diferentes a la secreción máxima alcanzada. Estos resultados concuerdan con la típica respuesta dosis-dependiente de secreción neta de amilasa estimulada por CCK-8 encontrada por Rosado y colaboradores (2002) en células acinares, en donde la secreción máxima de amilasa se produjo a una concentración de CCK-8 de  $10^{-9}$  M, aunque a diferencia de nuestros resultados, estos autores observan una marcada caída de la secreción de amilasa a concentraciones de CCK-8  $> 10^{-9}$  M.

De acuerdo a nuestro modelo, una vez que se produjo el daño en las células AR42J con ceruleína ( $10^{-8}$  M) durante 24 h (CeNM), se determinó la secreción de amilasa estimulada con CCK-8 ( $10^{-11}$  –  $10^{-7}$  M) como prueba de funcionalidad celular en el proceso de secreción exocrina.

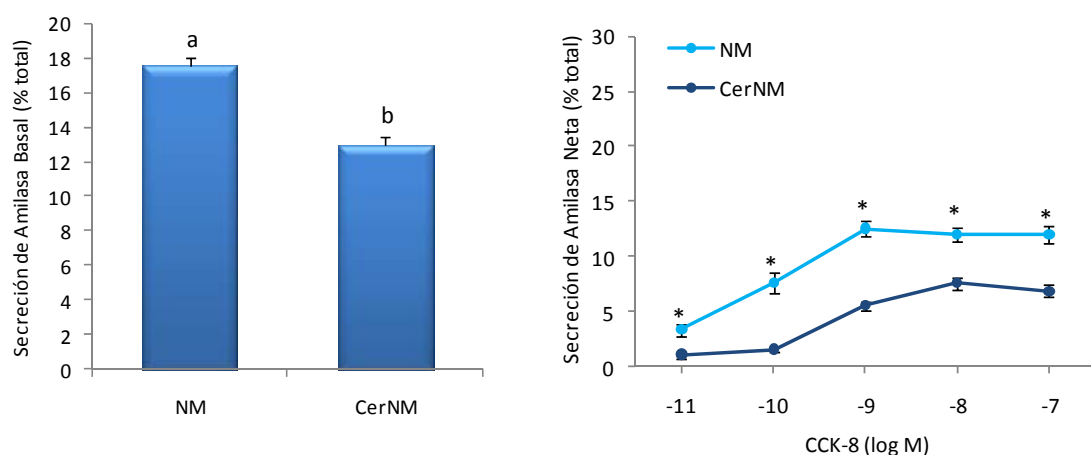
Así, en nuestro modelo *in vitro* de pancreatitis aguda (CeNM), la ceruleína ( $10^{-8}$  M) produjo una disminución de la secreción neta de amilasa estimulada para todas las concentraciones de CCK-8 empleadas ( $10^{-11}$  –  $10^{-7}$  M). Además, la ceruleína alteró la sensibilidad de la célula acinar pancreática AR42J, ya que la secreción neta máxima de amilasa se produjo a una concentración de CCK-8 mayor,  $10^{-8}$  M. Estos resultados concuerdan con los encontrados por otros autores (Morisset *et al.*, 1987; Zabel-Langhennig *et al.*, 1999) en modelos de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en ratas, en donde la secreción máxima estimulada de amilasa disminuyó.

A la luz de los resultados podemos deducir que ceruleína produjo alteraciones de los mecanismos secretores y de la sensibilidad de la célula AR42J diferenciada a CCK-8. Sin embargo, este secretagogo a concentraciones  $\geq 10^{-9}$  M se estimuló la secreción de amilasa, lo que significa que a pesar de las diferencias existentes con los niveles de secreción estimulada del grupo NM, la célula acinar pancreática AR42J diferenciada aún permanece funcional, aunque haya una reducción de la potencia y eficacia de CCK-8.

Siguiendo esta misma línea, Morisset y cols. (1987) plantearon que las alteraciones producidas por ceruleína en el proceso secretor ocurrirían, en el caso de la estimulación colinérgica, paso a paso en donde estarían involucrados tres mecanismos independientes interrelacionados:

1. Pérdida de la sensibilidad de la célula acinar al agonista colinérgico.
2. Reducción significativa en la capacidad secretora del acino pancreático.
3. Deterioro del proceso secretor que alcanza un estado-estacionario y simultáneamente se produce una progresiva disminución de la concentración de receptores muscarínicos.

Los resultados descritos por Morisset y cols. (1987), podrían indicar que la ceruleína altera la secreción de amilasa a través de una posible disminución del número de receptores de CCK.



En general, los resultados obtenidos tanto en los mecanismos inflamatorios como en los marcadores funcionales, junto con la evaluación de muerte celular y citotoxicidad, nos estarían confirmando la inducción de un daño inflamatorio semejante a la pancreatitis

inducida *in vivo*, en estas células, tras el tratamiento con ceruleína. Esto nos habla a favor de que se trata de un buen modelo experimental de pancreatitis *in vitro*.

## ***Efecto del HT***

### *Marcadores inflamatorios*

Son varios los estudios *in vivo* que describen un efecto antiinflamatorio del aceite de oliva rico en fenoles, o de fenoles aislados como el HT (Bogani *et al.* 2007; Leger *et al.* 2005; Visioli *et al.* 2005) mediante una disminución en los niveles plasmáticos de TXB2 y LTB4, ambas moléculas de marcado carácter proinflamatorio. Los trabajos *in vitro* apoyan estos resultados, y sugieren que gran parte de la actividad antiinflamatoria de estos compuestos se debe a los efectos anteriormente descritos sobre la expresión de COX-2 (Corona *et al.* 2007; Khanal *et al.* 2011), así como a una inhibición de la actividad de la 5- y 12-LOX (De la Puerta *et al.* 1999; Kohyama *et al.* 1997; Shureiqi & Lippman, 2001). Este hecho podría resultar del efecto preventivo que ha mostrado el HT en la activación del NF-kB en cultivo de macrófagos J774 (Maiuri *et al.*, 2005). La acción del HT sobre este factor de transcripción se traduce en el bloqueo de la transcripción de las enzimas COX-2 y LOX-5, reduciendo a su vez la síntesis de PGE2, y por tano disminuyendo el proceso inflamatorio (Cornwell *et al.*, 2008). En nuestro caso, los resultados obtenidos tanto en la activación del NF-kB como en la producción de mediadores inflamatorios (figura 23 A y tabla 15) son similares en los grupos MNHT y NM, lo que sugiere que en ausencia de un agente nocivo que genere un daño, como la ceruleína, la presencia de HT en el medio no induce ninguna alteración en la respuesta inflamatoria. Por lo que se podría decir que el HT *per se* no modifica el estado inflamatorio de la célula AR42J diferenciada, en ausencia de ceruleína.

### *Muerte celular*

#### Apoptosis/Necrosis

Los resultados del ensayo apoptosis/necrosis revelaron que las células AR42J diferenciadas, tras ser incubadas en presencia de HT, muestran un mayor porcentaje de

células vivas (figura 32 A). Son varios los autores que han observado este comportamiento al suplementar el medio de cultivo con antioxidantes. Así, Leist et al., (1996), en un estudio llevado a cabo con la línea celular L929, fibroblastos de ratón, demostró que en condiciones normales, los medios de cultivo convencionales podrían promover estrés oxidativo debido a una deficiencia en antioxidantes, por lo que una adecuada suplementación con éstos, mejoraría la viabilidad celular. En concreto, Quiles et al., (2002), observó que células procedentes de cáncer de próstata humana, línea celular PC3, cuando se trataban con hidroxitirosol producían un 50% menos de hidroperóxidos que las células control sin tratar. Todo parece indicar que este aumento en el porcentaje de células vivas en el grupo NMHT se debe al efecto antioxidante que aporta este compuesto al medio de cultivo.

También hemos observado que la presencia de HT en el medio, además de favorecer la viabilidad celular, produce un cambio en el patrón de muerte celular, de modo que el grupo NMHT presenta una relación apoptosis/necrosis 10 veces mayor que el grupo NM (figura 35 A). Probablemente se deba al efecto apoptótico de este compuesto, a través de diferentes mecanismos que ha sido descrito por varios autores, en células cancerígenas en cultivo (Han et al., 2009; Khanal et al. 2011; Della Ragione et al. 2000),. Ragione y colaboradores (2000) describieron que la apoptosis inducida por el HT es dependiente de la liberación del citocromo c desde la membrana mitocondrial, el cual a su vez activaría a la caspasa 3. Asimismo, se ha demostrado una modulación por parte del HT en la expresión y activación de proteínas reguladoras de la apoptosis, como Bcl-2 o Bax (Della Ragione et al 2002; Fini et al. 2008), junto con un aumento en la actividad de p53 (Khanal et al., 2011).

Probablemente, la presencia de hidroxitirosol en el medio de cultivo, durante estas 26 horas, disminuya el estrés oxidativo, balanceando la muerte celular hacia apoptosis en lugar de necrosis a través de alguno de los mecanismos comentados. Además, como mencionamos, la presencia de este compuesto en el medio de cultivo produce un aumento en el porcentaje de células vivas, corroborando el efecto antioxidante.

Todo esto pone de manifiesto el efecto positivo para las células AR42J de la presencia en el medio de HT, ya que no solo mejora las condiciones del medio de cultivo, sino que además disminuye la necrosis, recordando el efecto negativo que puede tener este tipo de muerte celular al desencadenar una respuesta inflamatoria.

## MTT

En nuestro caso, tras varios ensayos de MTT con diferentes concentraciones de HT, la dosis de 50  $\mu\text{M}$  fue la que mostró menor citotoxicidad en todos los grupos experimentales. Fue por este motivo por lo que eligió dicha concentración como la adecuada para utilizar en nuestro modelo experimental. No obstante, los resultados mostraron un comportamiento del HT muy diferente dependiendo del perfil lipídico de la membrana en los grupos en que se modificó, como se comentará más adelante.

El grupo NMHT presentó un porcentaje de viabilidad ligeramente mayor al del grupo NM (+7,7%;  $P=0.1$ ). Estos resultados se pueden relacionar con el aumento en el número de células vivas observado en este grupo por los ensayos de apoptosis/necrosis. Puesto que el porcentaje de viabilidad por MTT, es una medida proporcional de la cantidad de formazán producido, cuantas más células vivas haya en el medio, mayor cantidad de formazán se producirá, y por tanto el porcentaje de viabilidad aumentará.

Este aumento en la viabilidad probablemente sea un reflejo de la actividad antioxidante del HT en estas condiciones, de manera que esté mejorando el entorno oxidativo de la célula, bien por el barrido de ERO y/o porque esté contribuyendo a mejorar las defensas antioxidantes de la célula, como se muestra en los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo, donde se observó un aumento del glutatión reducido (GSH) en este grupo (resultados aun no publicados del proyecto de investigación Ref. AGL2006-05005/ALI). De un modo u otro, según nuestros resultados, el HT podría estar favoreciendo la integridad de la función mitocondrial.

## *Funcionalidad celular*

### Concentración citosólica de calcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ )

Estudios *in vitro* llevados a cabo en células no excitables, concretamente linfocitos, han puesto de manifiesto la acción del HT sobre los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  provocando un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Palmerini et al., 2005). Asimismo, Castillo-vaquero y colaboradores (2010) en un estudio llevado a cabo en células AR42J diferenciadas (DX 100 nM) mostraron un efecto similar en el tratamiento con melatonina, a través de un efecto

sobre los almacenes intracelulares, RE principalmente, en ausencia de secretagogo. En nuestro caso, el grupo NMHT presenta valores basales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico mayores a los obtenidos en el grupo NM (194,45 nM y 113,65 nM, respectivamente). Aunque no se consideran diferencias significativas ( $P=0,07$ ), el análisis factorial pone de manifiesto que se trata de un efecto principal del antioxidante sobre la variable ( $p=0,000$ ). Posiblemente el HT esté produciendo un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , en ausencia de secretagogo, por los mecanismos comentados antes o incluso a través de la depleción de los almacenes mitocondriales, lo que se relacionaría con una mejora en el potencial de membrana mitocondrial y una mejor funcionalidad de la misma, coincidiendo con los resultados obtenidos en MTT (Kumari et al., 2011).

Al igual que lo observado por otros autores (Rivera-Barreno et al., 2010; Camello et al., 2000) el tratamiento con antioxidantes, en nuestro caso HT, produce una disminución en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico a CCK-8. Los resultados del análisis factorial ponen de manifiesto el efecto del HT en el incremento del pico ( $P=0,006$ ), de manera que el grupo NMHT muestra una ligera disminución, alcanzando un valor medio de 696,50nM frente a 880,51 nM en el grupo NM ( $P=0,1$ ). Esta disminución en la respuesta a CCK-8 podría deberse a que el HT pudiera ejercer un efecto de barrido sobre los ERO, los cuales a su vez, se ha demostrado que aumentan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares (Martínez-Burgos et al., 2006), de modo que este efecto podía interferir en la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares, debido a la interrelación existente entre ERO y  $\text{Ca}^{2+}$ . Así pues, el HT podría estar retirando las ERO producidas por el secretagogo, que a su vez disminuiría la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol, expresándose probablemente en esa disminución del IP que observamos en el grupo NMHT. No obstante, también puede deberse a que el HT esté favoreciendo la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol mediante la bomba PMCA, la cual es sensible a ERO, de manera que el HT a través de su efecto de barrido disminuya las ERO y aumente el funcionamiento de esta bomba impidiendo por tanto un IP elevado dentro de la célula, ya que se está favoreciendo la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Rivera-Barreno et al., 2010).



## Amilasa

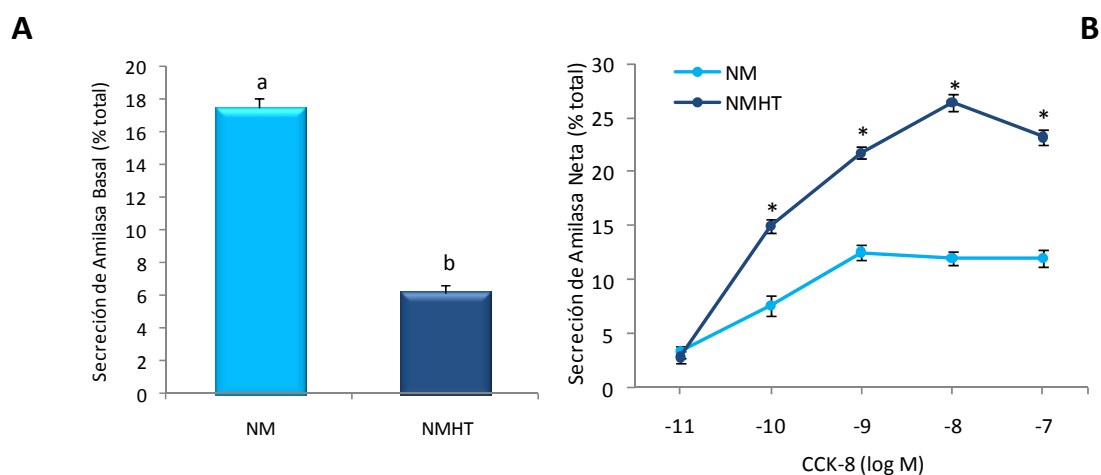
### **Secreción basal de amilasa**

La información que existe acerca del efecto de HT<sup>1</sup> sobre la secreción basal de amilasa es muy escasa o nula, no tenemos antecedentes que nos permitan discutir la causa de porqué el HT produjo una reducción significativa de la secreción de amilasa en nuestras células estén o no dañadas. Existe un trabajo realizado por Rivera-Barreno y cols. (2010) en donde estudian el efecto de un polifenol (cinnamtannina B-1) sobre la secreción de amilasa, sin embargo no encuentran efectos sobre la secreción de amilasa basal.

### **Secreción neta de amilasa estimulada por CCK-8**

El HT aumenta significativamente la secreción neta de amilasa estimulada por concentraciones de CCK-8  $> 10^{-10}$  M. Además, disminuye la sensibilidad de la célula acinar pancreática AR42J diferenciada (NM), ya que la secreción máxima de amilasa se produjo a una concentración de CCK-8 de  $10^{-8}$  M. Posteriormente, a concentración de CCK-8 de  $10^{-7}$  M se produjo un bloqueo secretor el cual se hizo más evidente por la disminución significativa de la secreción neta de amilasa a esta concentración (figura 50).

Como hemos mencionado antes, no existen estudios que evalúen el efecto de HT<sup>1</sup> sobre el páncreas, ni menos aún sobre la pancreatitis aguda. Sin embargo, existen algunos estudios que evalúan el efecto de compuestos polifenólicos como la cinnamtannina B-1 sobre la secreción neta de amilasa estimulada por CCK-8 en células acinares de ratón. Así, Rivera-Barreno y colaboradores (2010) encontraron que la cinnamtannina B-1 no produjo efectos sobre la secreción máxima de amilasa, ni sobre la sensibilidad de la célula acinar, a diferencia de nuestros resultados que sí encontramos efectos en ambos parámetros. En cuanto a la secreción de amilasa estimulada, estos autores observaron que cinnamtannina B-1 aumentó la secreción pero que solo fue significativamente mayor a concentraciones de CCK-8 de  $10^{-9}$  y  $10^{-8}$  M. En esto, nuestros resultados concuerdan en parte con estos hallazgos, tanto la cinnamtannina B-1 como el HT<sup>1</sup>, aumentan la secreción de amilasa estimulada, aunque nosotros encontramos diferencias significativas a partir de una concentración de CCK-8 de  $10^{-10}$  M. Además, ambos compuestos retrasan el bloqueo secretor originado por concentraciones supramáximas de CCK-8.



**Figura 55. A.** Secreción de amilasa basal del grupo NM (color claro) y el grupo NMHT (color oscuro). **B.** Secreción de amilasa neta del grupo NM (color claro) y el grupo NMHT (color oscuro)

Rivera-Barreno y colaboradores. (2010) atribuyen a que cinnamtannina B-1 puede contrarrestar, en parte, la inhibición de la secreción de amilasa estimulada por concentraciones supramáxima de CCK-8 reduciendo la producción de ERO. Ya que altas concentraciones de CCK-8 inducen generación de ERO (Granados *et al.*, 2004) y esto a su vez, inhibe la secreción de amilasa (Rosado *et al.*, 2002). Esta teoría puede ajustarse en parte a nuestro caso, ya que ambos compuestos tienen en su estructura química al menos un grupo hidroxilo en posición orto que se relaciona con un mayor efecto antioxidante (Raederstorff, 2009) y además, hemos comprobado que el HT mejora el estatus antioxidante en nuestras células. De hecho, se ha demostrado que las ERO aumentan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares (Martínez-Burgos *et al.*, 2006) y de acuerdo con los datos anteriores, el HT disminuye el incremento de pico de calcio citosólico lo que se traduciría en una disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol.

## ***Efecto del HT en el tratamiento con Ceruleina***

### *Respuesta inflamatoria*

Al igual que lo observado por otros autores (Yu et al., 2002), en nuestro caso el tratamiento previo con HT y la presencia de este compuesto durante el tratamiento con ceruleina, produce una disminución en la respuesta inflamatoria, por lo que el grupo CeNMHT presentó niveles nucleares de p65 más bajos y una menor producción del IL-6 respecto al grupo CeNM (ambos parámetros con un  $p < 0,05$ ). Yu y colaboradores (2005) sugirieron que la activación del NF- $\kappa$ B y el aumento en la producción de IL-6 tras el tratamiento con ceruleina podría ser dependiente de NADPH oxidasa, inducida por la ceruleina. Estos datos junto con los obtenidos en células AR42J tratadas previamente con HT y ceruleina, sugieren que las ERO generadas por la ceruleina activarían al factor de transcripción sensible al estado oxidativo, NF- $\kappa$ B, resultando en una regulación a la alza de la expresión de genes de citocinas proinflamatorias como la IL-6, en la célula acinar. Por lo que el HT podría estar actuando como neutralizador de ERO y con esto, disminuir la activación de dicho factor de transcripción.

Por otra parte, sin excluir un posible efecto antioxidante del HT en estas células, se ha observado que el HT puede inhibir el NF- $\kappa$ B a través de la formación de aductos de Michael que pueden reaccionar con un residuo de cisteína que presenta el NF- $\kappa$ B, y que es clave en su capacidad de unión al DNA (Cornwell et al., 2008). Esto explicaría el hecho de que la concentración citoplasmática de I $\kappa$ B $\alpha$  en el grupo CeNMHT sea similar a los del grupo CeNM y sin embargo los niveles de nucleares de p65 unidos a su diana en el DNA sean menores. Esto sugiere que en el grupo CeNMHT, la ceruleina estaría ejerciendo su efecto a través de la cascada de señalización que comienza con la activación de la PLC y finaliza con la degradación de las proteínas I $\kappa$ B $\alpha$ , y subunidades libres para su traslocación al núcleo (Sato et al., 2004), pero el HT estaría interaccionando con el residuo de cisteína a través de la formación de los aductos de Michael, e inhibiendo por tanto la unión de dicho factor al ADN.

## *Muerte celular*

### Apoptosis/necrosis

Con respecto al tratamiento conjunto de ceruleina y HT, se observó una gran recuperación respecto al daño causado por la ceruleina (figura 31). Al ser incubados previamente con HT y posteriormente, junto con ceruleina, los grupos Ce-8NMHT y Ce-7NMHT mostraron un aumento en el porcentaje de células vivas, y una disminución de apoptosis y necrosis. Cabe destacar que el patrón observado en el ensayo apoptosis/necrosis en los grupos Ce-8NMHT y Ce-7NMHT, es similar al del grupo NMHT y no al NM, lo parece indicar que el HT no solo está anulando el efecto dañino de la ceruleina, sino que además mantiene sus efectos positivos en cuanto al cultivo celular y al fomento de apoptosis en lugar de la necrosis que comentábamos en apartados anteriores.

Probablemente el HT esté actuando disminuyendo el estrés oxidativo que genera la hiperestimulación con ceruleina y esté evitando la muerte celular observada en los grupos Ce-8NM y Ce-7NM, bien por eliminación de las ERO generadas por el agente nocivo, o por una mejora en las defensas oxidativas (resultados aun no publicados del proyecto de investigación Ref. AGL2006-05005/ALI). Además, este compuesto no solo actúa como un potente neutralizador de radicales libres como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, etc. sino que también tiene un importante efecto quelante en metales como el hierro, disminuyendo la aparición de especies reactivas de oxígeno derivadas de reacciones asociadas con este metal (Bovicelli et al., 2007). Esta podría ser la explicación a la gran recuperación observada en los grupos Ce-8NMHT, Ce-7NMHT.

### MTT

Sorprendentemente el aumento de células vivas que se observó en los ensayos de apoptosis/necrosis en los grupos tratados con HT y ceruleina  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M, no se aprecia en el ensayo de MTT. Teniendo en cuenta las diferencias entre las dos técnicas, donde el ensayo apoptosis/necrosis se basa en la integridad de la membrana y el MTT en la funcionalidad mitocondrial, este hecho podría deberse por un lado a un problema

temporal (Madesh et al., 1997), donde el HT esté retrasando el daño celular, de modo que a las 26 h no se observen aún los daños producidos por la ceruleína a nivel de membrana, pero sí la disfunción mitocondrial producida por este secretagogo; o bien a que el HT esté protegiendo a la célula de los daños oxidativos inducidos por la ceruleína que alteran la membrana, pero no ante el daño citotóxico a nivel de mitocondria.

No obstante, se observa que para la concentración de ceruleína  $10^{-7}$  M, la presencia del HT mejora la viabilidad, no existiendo diferencias significativas con la viabilidad obtenida en los grupos NM y NMHT. Esto nos puede indicar que los efectos del HT son dependientes del ambiente celular (Bravo et al., 1998). De modo que la concentración de ceruleína  $10^{-7}$  M puede estar produciendo un ambiente oxidativo, dentro de la célula, que favorece la potenciación del efecto antioxidante del HT.

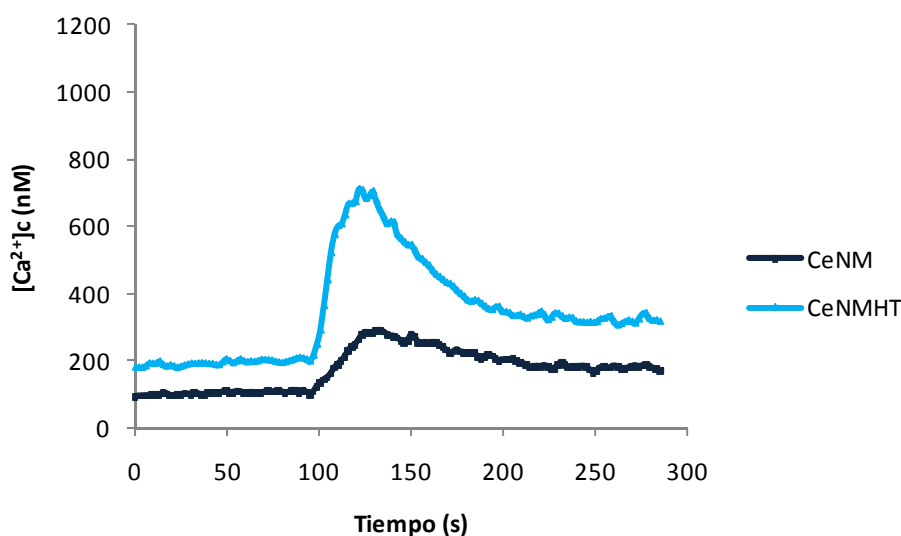
### *Funcionalidad celular*

#### Concentración citosólica de calcio

En primer lugar cabe destacar que el grupo CeNMHT presenta mayor  $[Ca^{2+}]_c$  basal que el grupo CeNM, existiendo entre ambas diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) (figura 42 A). De hecho, no presenta valores similares al grupo NM ( $P < 0,05$ ), sino a los obtenidos en el grupo NMHT. Podemos atribuir estas diferencias a la capacidad del HT de interactuar con los almacenes de  $Ca^{2+}$  intracelulares en ausencia de secretagogo que comentábamos cuando analizábamos el efecto *per se* del HT (Palmerini et al., 2005), lo que sugiere que la presencia de ceruleína no interfiere en el efecto del HT sobre la movilización de  $[Ca^{2+}]_c$  en condiciones basales. De hecho el análisis factorial pone de manifiesto que no existe una influencia, como componentes principales de la ceruleína y el HT sobre la  $[Ca^{2+}]_c$  basal ( $P = 0,880$ ).

Si analizamos las diferentes partes de la curva temporal de  $[Ca^{2+}]_c$  en respuesta a CCK-8 en el grupo CeNMHT, observamos que la presencia de HT produce un aumento significativo tanto en el IP como en el ABC respecto a la disminución que produjo el tratamiento de ceruleína solo. El IP del grupo CeNMHT es similar al del grupo NMHT, pero menor significativamente al IP que se obtuvo en el grupo NM. Estos resultados nos sugieren varias posibilidades. Por una lado, se ha observado que existe una interacción entre la ceruleína y el HT, en la primera parte de la curva en respuesta a CCK-8 (IP), de manera que

el HT en ausencia de ceruleína actúa en un sentido, disminuyendo el IP respecto a NM, sin embargo en presencia de ceruleína actúa en sentido contrario, aumentando el IP respecto al grupo CeNM. Esta interacción se confirmó con el análisis factorial ( $P=0,000$ ). Por otro lado, el hecho de que el IP del grupo CeNMHT sea similar al del grupo NMHT podría indicar que el tratamiento previo con HT y su presencia durante el tratamiento con ceruleína  $10^{-8}$  M, podría estar ejerciendo un efecto protector frente al daño producido por la hiperestimulación con ceruleína  $10^{-8}$  M durante 24 h, probablemente a través de la disminución de las alteraciones en las vías de señalización que podía producir la ceruleína (ver pág. 202) mediante un efecto de barrido de las ERO producidas tras dicha supraestimulación, evitando la cascada desencadenada por estas. Además, la pendiente del IP que muestra el grupo CeNMHT es mayor que en el grupo CeNM (figura 56), pareciéndose más a la del grupo NM, sugiriendo que la velocidad de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares se ha restaurado.



**Figura 56.** Curvas de evolución temporal de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ), en respuesta a CCK-8 ( $10^{-9}$  M), en células AR42J diferenciadas con dexametasona (100 nM), tratadas con ceruleína ( $10^{-8}$  M) durante 24 horas (CeNM; línea oscura), y sin tratadas con ceruleína en presencia de HT (CeNMHT; línea clara). Los valores están expresados como valores medios ( $n=6$  en cada grupo, y pertenecientes al menos de tres lotes diferentes de células).

Respecto al índice IP/ABC, es mayor, significativamente, en el grupo CeNMHT respecto a CeNM, aunque no llega a alcanzar los valores que muestran los grupos NMHT y NM. Probablemente la ceruleína esté produciendo un daño celular, bien a través de una

sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico o una generación excesiva de ERO, que a su vez pueden comprometer la producción del ATP por un daño en el potencial de membrana mitocondrial, y por tanto alterar la función de las ATPasas encargadas de aclarar el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Asimismo, se ha demostrado que la bomba PMCA es sensible ERO (Bruce et al., 2007), por lo que la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el exterior podría estar dañada, de modo que la presencia de un antioxidante, probablemente por la acción de barrido podría restaurar parcialmente dicho transporte, favoreciendo el transporte a través de la bomba PMCA (Rivera-Barreno et al., 2010). El hecho de que la presencia de HT aumente el índice IP/ABC, pero no hasta los valores que muestran los grupos NM o NMHT, posiblemente se deba a que la ceruleína esté ejerciendo un daño por otra vía adicional que el HT no puede proteger, lo que se relacionaría con los resultados de MTT, donde a pesar de mostrar mayor porcentaje de células vivas por apoptosis/necrosis, el grupo CeNMHT no mostró un mayor porcentaje de viabilidad en función de la actividad mitocondrial.

No obstante, son varios los autores que, al igual que nosotros, han observado un efecto beneficioso de los antioxidantes en la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en condiciones donde se encuentra alterada la señalización de dicho ion (Bouaziz et al., 2007). En nuestro caso podemos decir que el HT ejerce un efecto protector frente al daño producido por la hiperestimulación con ceruleína en la movilización de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en respuesta a CCK-8.

### Secreción de Amilasa

En nuestro modelo *in vitro* de pancreatitis aguda (CeNM), el HT también produjo un aumento significativo de la secreción de amilasa estimulada por concentraciones de CCK-8  $> 10^{-10}$  M, aunque no fue tan marcado como en el caso del grupo NMHT (figura 49). De este modo, el HT fue capaz de prevenir el deterioro que ceruleína produjo sobre los mecanismos de secreción de amilasa estimulada, recuperando los niveles de secreción que se observaron en la célula AR42J diferenciada (NM). Aunque, no aumenta la sensibilidad de la célula en respuesta a CCK-8, ya que la secreción máxima de amilasa se sigue produciendo en respuesta a una concentración de CCK-8 de  $10^{-8}$  M y no a  $10^{-9}$  M como ocurría en el grupo NM.

Camello-Almaraz y colaboradores (2008) estudiaron el efecto de la melatonina en células acinares pancreáticas de ratones senescentes la secreción neta de amilasa estimulada por

CCK-8. Salvando las diferencias de los mecanismos involucrados en esta situación, la secreción neta de amilasa estimulada por CCK-8 en las células pancreáticas senescentes está deteriorada al igual que en nuestro modelo *in vitro* de pancreatitis aguda (CeNM). Estos autores comprobaron que la melatonina aumentó la respuesta secretora de las células pancreáticas senescentes a los valores observados en células acinares de páncreas de ratones jóvenes. Al igual que ocurre con la melatonina, el HT es capaz de prevenir el deterioro producido en los mecanismos secretores de amilasa estimulada.

## **Modelo de Pancreatitis Aguda en células AR42J diferenciadas con membranas modificadas enriquecidas en ácido oleico**

### ***Efecto del ácido graso***

#### *Respuesta inflamatoria*

En cuanto a la respuesta inflamatoria que pudiera desencadenar la presencia del ácido graso en el medio, o incluso la propia modificación de las membranas, nuestros resultados revelan que no existen diferencias respecto al grupo NM. Por lo tanto, el enriquecimiento de las membranas en ácido oleico (C18:1 n-9) no produce una activación del NF- $\kappa$ B. Asimismo, respecto a la producción de citocinas inflamatorias tampoco existen diferencias con el grupo NM en ninguno de los mediadores inflamatorios analizados.

Estos datos nos sugieren que la modificación de las membranas como tal, no modifica la respuesta inflamatoria en ausencia de un agente nocivo como es la ceruleína. De modo que la manipulación de la membrana no desencadena una respuesta inflamatoria.

#### *Mecanismos de muerte celular*

Tanto los resultados correspondientes al ensayo apoptosis/necrosis como MTT coinciden en que el grupo MO, que son células AR42J diferenciadas que han sido incubadas durante 72 h con ácido oleico (50  $\mu$ M), presentan una menor viabilidad que las incubadas sin ácidos grasos, grupo NM (figura 32). Además, presentan un mayor porcentaje de apoptosis y necrosis al compararlas con el grupo NM (figura 31).

Esta disminución en la viabilidad del grupo MO revela un descenso en la función mitocondrial relacionado probablemente con la presencia de ácido oleico libre en el medio,



el cual puede estar ejerciendo un efecto citotóxico en la célula. De hecho, son varios los autores que han observado este efecto cuando ponen ácidos grasos en el medio. Zhou y colaboradores (2009), observaron en células endoteliales de cerebro humano, que la presencia de ácidos grasos libres en el medio, induce estrés oxidativo y produce una disminución de la viabilidad. A su vez, Campoio y colaboradores (2011) también describen un aumento en la producción de ERO, acompañado por una reducción en el contenido de GSH, en linfocitos tratados con una mezcla de ácidos grasos. En nuestro caso, este descenso en la viabilidad en el grupo MO, también vino acompañado con una disminución en el GSH (resultados aun no publicados del proyecto de investigación Ref. AGL2006-05005/ALI), lo que estaría indicando una actuación de las defensas antioxidantes de la célula para combatir el estrés oxidativo generado por la presencia del ácido graso en el medio.

El mecanismo por el cual el ácido oleico libre en el medio puede aumentar la producción de ERO en la célula podría ser a través de una actuación mitocondrial, inhibiendo la cadena de transporte electrónico. De hecho, Schönfeld y colaboradores (2006) pusieron de manifiesto en mitocondrias de cerebro de rata, una interacción entre varios ácidos grasos y la cadena de transporte electrónico, observando tanto un aumento en ERO, principalmente anión superóxido, como la inactivación de la actividad enzimática de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, disminuyendo con esto la reducción del compuesto MTT hacia formazán por parte de las enzimas mitocondriales.

Esta supuesta interacción entre el ácido oleico libre en el medio y la mitocondria podría ser la causante del aumento de apoptosis que presenta el grupo MO respecto al NM, a través de la activación de vías de señalización intracelulares sensibles a condiciones de estrés como el p38 MAPK.

Si bien, aunque en nuestro caso dichos ácidos grasos se acomplejaron con albumina con el fin de evitar dicha toxicidad, podría ocurrir que no se acomplejaran en su totalidad, actuando por tanto, como sustancias tóxicas para la célula. Cabe resaltar que probablemente se deba a un efecto de la manipulación y no al hecho de que la membrana esté modificada.

### *Funcionalidad celular*

#### Concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_c$ )

A través de este ensayo pretendemos confirmar si la modificación del perfil de membrana con ácido oleico, interfiere en la respuesta funcional ante un secretagogo, en nuestro caso CCK-8 ( $10^{-9}$  M), en cuanto a la movilización del  $Ca^{2+}$  citosólico. En principio observamos que las  $[Ca^{2+}]_c$  basales del grupo MO, aunque ligeramente superiores, fueron similares a las del grupo NM (figura 41), no existiendo entre ellas diferencias significativas. Por lo que podríamos decir que la modificación de la membrana con ácido oleico no interfiere en el mantenimiento de las concentraciones basales de  $Ca^{2+}$  citosólico. Sin embargo, si analizamos la respuesta a secretagogo, observamos que el enriquecimiento de la membrana en ácido oleico incrementa la movilización de calcio tras la estimulación con CCK-8 (figura 40). Nuestros resultados coinciden con lo observado anteriormente por nuestro grupo en células acinares pancreáticas de ratas alimentadas con una dieta rica en ácido oleico, en respuesta a un secretagogo fisiológico (Martínez et al., 2004; Yago et al., 2004; Yago et al., 2006).

El incremento en la movilización de  $Ca^{2+}$  citosólico, lo observamos tanto en el IP como en una ABC mayores respecto al grupo NM. Estas diferencias pueden relacionarse con los cambios inducidos en la composición de la membrana, ya que el enriquecimiento diferencial en estos ácidos grasos puede estar influyendo en la accesibilidad de los receptores de CCK presentes en la membrana plasmática de la célula acinar, en la interacción con las proteínas G, o incluso en la funcionalidad de enzimas tales como fosfolipasas y PKC, la cual interacciona con la membrana celular durante su activación.

Además de su papel estructural, los ácidos grasos de membrana participan como mediadores en la transducción de la señal. Como se comentaba en el apartado de antecedentes, la existencia de receptores CCK y Ach en el páncreas exocrino de rata está bien establecida, al igual que su vinculación con la PLC, cuya activación provoca la hidrólisis del  $IP_2$  y la subsiguiente producción de  $IP_3$  y DAG. Las modificaciones en la membrana observadas tras la incubación de las células AR42J con ácido oleico podrían estar razonablemente involucradas con una alteración en el *turnover* de fosfoinositoles y con la modificación en la distribución de los lípidos precursores.

Se ha demostrado que la activación de receptores de alta afinidad por concentraciones bajas de CCK-8, está asociada a una fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica dependiente de Ca<sup>2+</sup> (cPLA<sub>2</sub>), y en menor grado a la PLC (Gonzalez et al., 1999). Por otro lado, el ácido araquidónico liberado de los fosfolípidos de membrana a través de la cPLA<sub>2</sub> enlentece la propagación de la señal de Ca<sup>2+</sup> inducida por CCK-8 (González et al., 1999), así como el recambio de fosfoinositoles en el páncreas exocrino, conduciendo a una reducción de la formación de IP<sub>3</sub> inducida por secretagogo (Chaudhry y Rubin, 1990). Así, diferencias en la producción de IP<sub>3</sub> entre las células AR42J modificadas con ácido oleico y no modificadas, podría ser la explicación a nuestros resultados de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a CCK-8, teniendo en cuenta que el incremento inicial de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> en respuesta a secretagogo se debe principalmente a la salida de Ca<sup>2+</sup> desde los almacenes intracelulares sensibles a IP<sub>3</sub> (Petersen et al., 2009). De hecho, las membranas del grupo MO presentan una cantidad significativamente menor de AA, que el grupo NM (tabla 13).

Resulta interesante destacar que la relación IP/ABC es similar en ambos grupos, MO y NM, lo que nos indica que aunque la respuesta de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> a CCK-8 se encuentra aumentada en el grupo MO, la respuesta a largo plazo (fase de caída que depende de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de la membrana) es semejante a la del grupo NM. Luego los mecanismos de recaptación y extrusión de calcio son similares en ambos grupos. Por lo que esta modificación de la membrana interfiere en la respuesta a corto plazo, pico máximo que representa la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos intracelulares en respuesta a secretagogo (IP), pero no en la respuesta a largo plazo.

## Amilasa

### Secreción de amilasa basal

Al enriquecer las membranas de las células AR42J diferenciadas en ácido oleico la secreción basal de amilasa disminuyó. Estos resultados no concuerdan a los obtenidos en acinos de ratas en los que la secreción basal de amilasa fue similar a la del grupo control (Martínez *et al.*, 2004; Yago *et al.*, 2006).

### Secreción neta de amilasa estimulada por CCK-8

En células AR42J cuyas membranas se enriquecieron en ácido oleico (MO) encontramos que al ir aumentando la dosis de CCK-8, la secreción de amilasa aumentó hasta alcanzar una secreción máxima a una concentración de CCK-8 de 10<sup>-8</sup> M e inmediatamente se produjo el efecto *plateau*. A diferencia de las células del grupo NM, la secreción de amilasa

estimulada en el grupo MO fue menor a concentraciones de CCK-8  $<10^{-8}$  M, mientras que a mayor concentración de CCK-8 la secreción fue la misma. En cuanto a la sensibilidad frente al secretagogo también se observan diferencias respecto al grupo NM, el enriquecimiento de las membranas con ácido oleico alteró la sensibilidad de las células del grupo NM a CCK-8, ya que la máxima secreción de amilasa se produjo a una concentración de  $10^{-8}$  M y no de  $10^{-9}$  M como ocurre en el grupo NM.

Estos resultados difieren de los encontrados por Martínez y colaboradores (2004) en células acinares de ratas alimentadas con una dieta rica en aceite de oliva, en donde la secreción estimulada por CCK-8 fue mayor a la observada en el grupo control. En cuanto a la sensibilidad de la célula acinar no se observaron modificaciones en las células acinares del grupo oliva respecto a las células del grupo control, ya que no existían cambios en la secreción máxima.

## ***Efecto de la ceruleina***

### *Respuesta inflamatoria*

A diferencia de lo que vimos en el grupo de células AR42J con membranas sin modificar, en el caso de las células con membranas enriquecidas en ácido oleico, del tratamiento con ceruleina no produce una activación de la respuesta inflamatoria. Concretamente, los niveles nucleares de p65 en el grupo CeMO son similares a los del grupo MO, y en cuanto a la producción de mediadores inflamatorios no existen diferencias significativas entre el grupo MO y CeMO.

El efecto beneficioso, incluso antiinflamatorio, del consumo de ciertos ácidos grasos como el ácido oleico, componente mayoritario del aceite de oliva, es ampliamente conocido en enfermedades como la artritis reumatoide, y enfermedades cardiovasculares (Mataix y Gil 2002; Pérez-Jiménez 2007). Asimismo, datos obtenidos de un estudio *in vitro* nos hablan a favor de una interferencia entre la activación del NF- $\kappa$ B y el ácido oleico adicionado al medio de cultivo en células endoteliales, revelando una disminución de la activación de dicho factor de transcripción en presencia del ácido graso, tras ser estimuladas con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (Carluccio et al., 1999).

Ferreira y colaboradores (2002), en un estudio llevado a cabo en ratas con pancreatitis inducida por ceruleína, observaron cambios en la composición lipídica de las membranas celulares de dichos animales, mostrando una significativa disminución en el contenido total de fosfolípidos de membranas, junto con un aumento concomitante de sus formas lisoderivadas, incrementándose la susceptibilidad de estas membranas a sufrir peroxidación lipídica. Teniendo en cuenta que uno de los factores que intervienen en la activación del NF- $\kappa$ B es la generación excesiva de ERO que tiene lugar en la célula tras la hiperestimulación con ceruleína (Yu et al., 2002, 2005b), el hecho de que el tratamiento con ceruleína en las membranas modificadas con ácido oleico no modifique la activación de dicho factor de transcripción, podría relacionarse con la gran estabilidad que presentan las membranas enriquecidas en MUFA ante procesos oxidativos (Quiles et al., 2006; Bello et al., 2006). De hecho, estudios realizados en nuestro grupo han puesto de manifiesto tanto una menor cantidad de ERO como de isoprostanos en células AR42J enriquecidas en ácido oleico, respecto a células con membranas sin modificar, ambas estimuladas con ceruleína  $10^{-8}$  M (resultados aun no publicados pertenecientes al proyecto de investigación Ref. AGL2006-05005/ALI). Todo esto parece indicar que la ceruleína, en este grupo de membranas desencadena una menor generación de ERO lo que podría acontecer en una menor activación del NF- $\kappa$ B, que a su vez se traduce en una menor producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 (figura 28). De hecho, en el grupo CeNM se produce un aumento en la secreción de IL-6 respecto al grupo NM, mientras que el grupo CeMO presenta niveles similares de esta interleucina a los del grupo MO.

La estabilidad de las membranas ricas en ácido oleico posiblemente se deba a la presencia de un menor contenido de ácidos grasos poliinsaturados (figura 18), ya que la existencia de más de un doble enlace las convierte en membranas más susceptibles al daño de los radicales libres (Nakbi et al., 2010). Además, contienen menos AA por lo que ante un estímulo específico, como la ceruleína, se activarían las enzimas que hidrolizan los fosfolípidos de la membrana, una de ellas es la fosfolipasa  $A_2$  (PLA $_2$ ), dando lugar a AA, que forman (en el retículo endoplásmico liso y en la membrana nuclear) eicosanoides mediante reacciones de oxidación (peroxidación lipídica) en las que participan las ciclooxigenas (COX-1 y COX-2), y lipooxigenasas (n-LOX), produciéndose por tanto, menor cantidad de mediadores inflamatorios que en las membranas NM, como por ejemplo la PGE $_2$  relacionada a su vez con la activación del NF- $\kappa$ B (Camandola et al., 1996).

En el caso de la pancreatitis aguda, como venimos comentando, son varios los estudios que han determinado que el resultado de la enfermedad depende del balance entre los niveles de citocinas anti y proinflamatorias (Norman et al., 1998; Dignam et al., 1983). En nuestro caso, el modelo de pancreatitis fue mediante estimulación con ceruleína  $10^{-8}$  M, por lo que para ver el posible efecto protector de la membrana habría que fijarse en el valor del índice IL-10/IL-6 de los grupos CeNM y CeMO. Mientras que no existían diferencias significativas respecto a este índice entre los grupos NM y MO, el grupo CeNM muestra un valor significativamente menor al grupo CeMO ( $P= 0.028$ ). Estos resultados ponen de manifiesto que mientras que en ausencia de un agente nocivo la modificación de la membrana no produce cambios en la respuesta inflamatoria, en presencia de ceruleína, las membranas de las células AR42J adaptadas a ácido oleico presentan un perfil lipídico que las protege frente al daño inflamatorio que causa la supraestimulación con.

### *Mecanismo de muerte celular*

#### Apoptosis/Necrosis

Los resultados referentes al ensayo de apoptosis/necrosis en el grupo de células AR42J con membranas modificadas en ácido oleico, ponen de manifiesto una fuerte resistencia de estas membranas ante el efecto apoptótico de la ceruleína. Así pues, el grupo CeMO presentó un porcentaje de células vivas similar al grupo MO (figura 32 B). Probablemente se deba a un menor estrés oxidativo como consecuencia del enriquecimiento de las membranas en ácido oleico y/o el balance en la acción de los mecanismos antioxidantes.

Entre los factores desencadenantes, la generación de ERO junto con la liberación de proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembrana de la mitocondria, pueden iniciar la activación de los diferentes tipos de muerte celular. La apoptosis puede iniciarse a partir de una gran variedad de señales y condiciones fisiopatológicas incluyendo estrés oxidativo (Hampton et al., 1998). Como comentamos en apartados anteriores (ver pág. 197), la apoptosis producida por ceruleína podía estar mediada a través de la vía intrínseca mitocondrial, cursando con la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa-9 que a su vez activa a la caspasa-3, proceso mediado por las proteínas canales Bax/Bak (Mareninova et al., 2006). A su vez, las membranas mitocondriales también pueden adaptar su perfil lipídico al perfil lipídico de la dieta, de hecho, en nuestro caso analizamos el perfil

lipídico de “membranas crudas” es decir, todas las membranas celulares, estudio que puso de manifiesto un enriquecimiento de estas en MUFA (figura 18), proporcionándoles a su vez mayor resistencia frente al estrés oxidativo, así como un efecto protector frente al envejecimiento celular (Bello et al., 2006; Quiles et al., 2006). De hecho existen estudios que demuestran que las mitocondrias con membranas enriquecidas en MUFA presentan una mejor funcionalidad y son más resistentes al proceso de apoptosis frente a las enriquecidas en otros tipos de ácidos grasos, mostrando una menor actividad de la caspasa-3 y un mayor potencial de membrana mitocondrial (Gutiérrez-Ríos 2009) . Esto explicaría la mayor estabilidad que muestran en nuestro caso las células MO ante los diferentes tratamientos.

Es importante resaltar, que a pesar de permanecer intacto el porcentaje de células vivas para ambas concentraciones de ceruleína, en el grupo Ce-7MO se aprecia un aumento de apoptosis y una disminución de la necrosis. Si tenemos en cuenta la relación apoptosis-mitocondria, podría sugerir que a esta concentración se puede estar produciendo un daño oxidativo a nivel mitocondrial, desencadenando una mayor activación de caspasas, que a su vez inducen la apoptosis y disminuyendo la necrosis (Mareninova et al., 2006).

## MIT

Al determinar la citotoxicidad de la ceruleína en este grupo de membrana observamos que la viabilidad en el grupo Ce-8MO es semejante a la del grupo MO (figura 38 B). Sin embargo, se observó una disminución con la concentración  $10^{-7}$  M. Puesto que esta técnica determina funcionalidad mitocondrial pone de manifiesto el carácter protector de estas membranas frente al daño con ceruleína que se comentaba en el apartado anterior, teniendo que forzar la dosis 10 veces más para poder observar una disminución en la viabilidad celular. Este efecto positivo de los MUFA se ha observado en varios estudios (Massaro et al., 2002; Aguilera et al., 2005; Nakbi et al., 2010). Estos resultados ponen de manifiesto que la reducción en viabilidad que se observó en el grupo MO respecto a NM (figura 36) se debía a la presencia del ácido graso en el medio y no a la modificación de la membrana en sí, puesto que la modificación como tal, según los resultados está ejerciendo un efecto protector.

La disminución en la viabilidad que muestra el grupo Ce-7MO probablemente se deba a un daño temprano en la función mitocondrial, causado por el tratamiento con ceruleína  $10^{-7}$  M, y que posiblemente aún no se ha expresado a nivel de la membrana plasmática, siendo este el motivo de que el porcentaje de células vivas fuera el mismo para ambas concentraciones. Si bien, aunque no se apreciaron diferencias entre el porcentaje de células vivas de los grupos Ce-8MO y Ce-7MO, se apreció un incremento de la apoptosis en este último grupo, confirmando con esto que podría deberse a una activación de caspasas posiblemente vía mitocondrial.

Por lo tanto, al igual que se observó en los resultados de apoptosis/necrosis, las membranas modificadas con ácido oleico, que presentan un menor índice de poliinsaturación, muestran un carácter protector frente al posible daño oxidativo ejercido por la ceruleína. Estos resultados concuerdan con resultados anteriores de nuestro grupo, donde se muestra una relación directa entre el grado de poliinsaturación de las membranas con la cantidad de peróxidos lipídicos e inversa a los niveles de antioxidantes (Mataix et al., 1998; Yago et al., 2005).

### *Funcionalidad celular*

#### Concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_c$ )

A diferencia de la protección ofrecida por este perfil lipídico frente a un agente nocivo, en cuanto a la respuesta inflamatoria y viabilidad celular, mostrando los grupos tratados con ceruleína valores similares al grupo MO, en el daño funcional este efecto no se observa, al menos en la movilización de la  $[Ca^{2+}]_c$  en respuesta a un secretagogo.

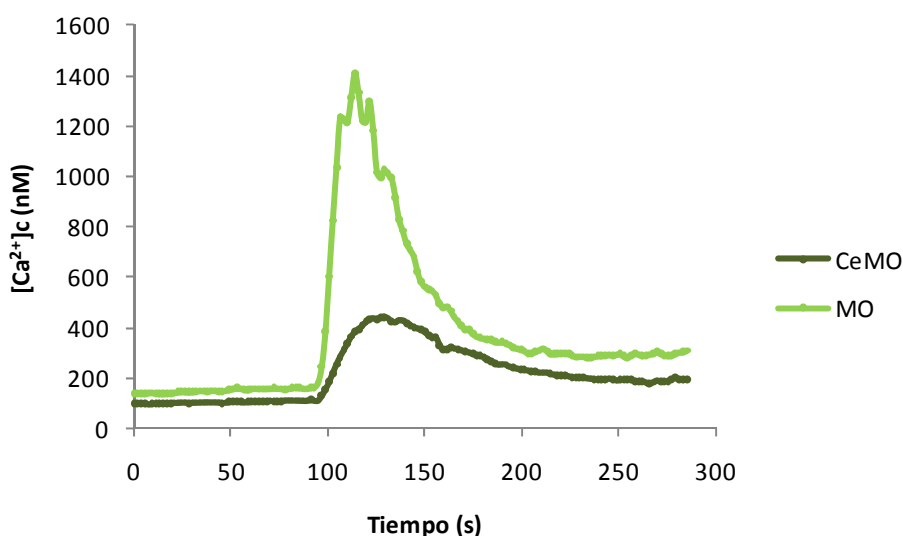
Al igual que ocurría en las células con membranas no modificadas, la ceruleína produce una disminución tanto en los niveles basales de  $Ca^{2+}$  citosólico, como en la respuesta a secretagogo, observando una disminución en el IP, ABC, y en el índice IP/ABC (figuras 45 y 57). Sin embargo, estos parámetros son superiores en el grupo CeMO al compararlos con el grupo CeNM.

Como comentamos anteriormente, la adaptación de la membrana al ácido oleico modificaba la respuesta de estas células al secretagogo, observando una respuesta mayor en el grupo MO, lo que argumentábamos como un posible efecto tanto a nivel de la



membrana, favoreciendo la accesibilidad de los receptores de CCK, como a nivel de la cascada de señalización intracelular, influyendo en la interacción con las proteínas de unión a nucleótidos de guanina, o incluso en la funcionalidad de enzimas tales como fosfolipasas y PKC (ver pág. 221). Por otro lado, veíamos que la ceruleína podía interferir en esa señalización, incluso a nivel de los receptores de membrana, produciendo una disminución en la respuesta (ver pág. 203).

Un aspecto importante a tener en cuenta es que, aunque la respuesta se encuentra alterada, sigue siendo mejor respuesta que la que muestra el grupo CeNM, de hecho el IP es mayor en el grupo CeMO que en CeNM. Tenido en cuenta que esta parte de la curva se debe principalmente a la salida de  $Ca^{2+}$  desde los almacenes intracelulares (Petersen et al., 2009), que no hay diferencias significativas entre las concentraciones basales de los grupos CeNM y CeMO (figura 42), y que la pendiente de subida del IP es mayor en el grupo CeMO (figuras 56 y 57), nos sugiere que la señalización tras la unión de la CCK-8 a sus receptores es mejor en este último grupo. Posiblemente se deba a que hay una mayor afinidad por los receptores CCK junto con una mayor *turnover* de fosfoinositoles, en el grupo CeMO, debido a la modificación del perfil lipídico. De manera que aunque la ceruleína pudiera alterar la interacción del secretagogo con sus receptores (Morisset et al., 1987), o interferir en la cascada de señalización, una mayor accesibilidad a los receptores junto con una mayor producción de  $IP_3$  en las membranas enriquecidas en ácido oleico, podrían disminuir el efecto negativo de la ceruleína y ser la causa de por qué los grupos CeMO presentan una mayor movilización de  $Ca^{2+}$  citosólico en respuesta a CCK-8.



**Figura 57.** Curvas de evolución temporal de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ), en respuesta a CCK-8 ( $10^{-9}$  M), en células AR42J diferenciadas con dexametasona (100 nM), con membranas modificadas en ácido oleico, tratadas con ceruleína ( $10^{-8}$  M) durante 24 horas (CeMO; línea oscura), y sin tratar (MO; línea clara). Los valores están expresados como valores medios ( $n=6$  en cada grupo, y pertenecientes al menos de tres lotes diferentes de células).

Respecto al índice IP/ABC es mayor en CeMO que en CeNM, lo que se relacionaría con un menor daño oxidativo producido por la ceruleína en estas membranas, de modo que la recaptación de este catión, donde interviene las Calcio-ATPasas (SERCA y PMCA), no se encuentra tan alterada como en el grupo CeNM. A su vez, al permanecer menos sostenida la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  se produciría, teóricamente, un menor daño celular.

De lo recogido a lo largo de la discusión, parece deducirse que el enriquecimiento de la membrana en MUFA las hace más resistentes al daño oxidativo que produce la ceruleína, lo que se traduce en una menor activación del NF-kB y menor disfunción mitocondrial, entre otros. En el caso de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en respuesta a CCK-8, observamos que aunque no puede evitar esta disminución en la respuesta, pero la contrarresta. Esto nos sugiere que las células AR42J con membranas modificadas en ácido oleico se podrían recuperar mejor del daño producido por ceruleína.

## Amilasa

### Secreción de amilasa basal

A diferencia de lo que se observó en las células AR42J diferenciadas cuyas membranas no se modificaron (NM), al producir un daño en las células del grupo MO (CeMO), la secreción basal de amilasa aumentó. Sin embargo, esto concuerda con los datos mostrados por Okada y cols. (1998) en un modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en ratas, en donde la secreción de amilasa basal fue más alta frente a la obtenida en el grupo control.

### Secreción neta de amilasa

Al igual que en las células del grupo CeNM, en el grupo CeMO la ceruleína  $10^{-8}$  M redujo la secreción neta de amilasa estimulada por concentraciones crecientes de CCK-8 ( $10^{-11}$  –  $10^{-7}$  M) y por otro lado, a bajas concentraciones no hubo una relación dosis-respuesta.

Además, el bloqueo secretor o el efecto *plateau* al igual que en grupo CeNM se produjo a partir de una concentración de CCK-8 de  $10^{-8}$  M (figura 49).

Por el contrario, la ceruleína no alteró la sensibilidad de las células del grupo MO por el secretagogo, ya que la secreción máxima neta de amilasa inducida por CCK-8, también ocurrió a una concentración de  $10^{-8}$  M. Debemos tener en cuenta que la modificación del perfil lipídico de las membranas con ácido oleico, *per se*, alteró la sensibilidad de las células a la estimulación con CCK-8.

Del mismo modo que hemos discutido antes, la ceruleína podría reducir la secreción de amilasa estimulada a través de la reducción de receptores de CCK lo mismo que ocurre con los receptores muscarínicos tras el tratamiento con el secretagogo (Morisset et al., 1987) y que puede estar relacionado con la disminución de la capacidad de unión de  $^{125}\text{I}$ -CCK a su receptor, la cual fue demostrada por Okada y cols. (1998) en un modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en rata.

Por otra parte, a pesar de que la capacidad de secreción del grupo CeMO esta disminuida al igual que en el grupo CeMN, el enriquecimiento de las membranas en ácido oleico, mejora el estatus oxidativo e inflamatorio que podría originar que el curso de la pancreatitis aguda sea menos grave.

## ***Efecto del HT***

### ***Respuesta inflamatoria***

La presencia de HT en el medio, al igual que se observó en las células con membranas sin modificar, en las células con membranas enriquecidas en ácido oleico no se aprecia una respuesta proinflamatoria en ausencia de agente nocivo. A nivel de la activación del NF- $\kappa$ B, el grupo MOHT presenta niveles nucleares de p65 similares al grupo MO, lo que se relaciona con valores similares del IL-6. Sorprendentemente, se ha observado una disminución en la producción de IL-10 e IL-1 $\beta$  en el grupo MOHT. Como consecuencia de esto se produce una disminución en el índice IL-10/IL-6 en este grupo respecto a MO. Al disminuir este índice indica que el estatus inflamatorio de la célula en condiciones normales estaría desequilibrado hacia la producción de la IL-6, una citocina

proinflamatoria, lo que sugiere un efecto negativo por parte de este compuesto en las células adaptadas con ácido oleico, independiente de NF-kB.

La IL-1 $\beta$  es una molécula de naturaleza glicoprotéica que se sintetiza en forma de precursor inactivo de 31 KDa, pro IL-1  $\beta$ , el cual requiere de la escisión intracelular por una cistein proteasa para pasar a su forma activa. Es la única citocina que presenta actividad únicamente en su forma madura (Dinarello, 1996; Nerad et al., 1992), y es considerada una citocina pro-inflamatoria. Sin embargo, la IL-10 es una potente citocina anti-inflamatoria. Probablemente el HT esté interfiriendo en la activación o expresión de ciertas citocinas en este tipo de células. De hecho, son varios los estudios que ponen de manifiesto la capacidad de algunos antioxidantes en la modulación de ciertos factores de transcripción (Jang et al., 2008; Ying et al., 2009) así como su influencia en la respuesta inflamatoria (González-Gallego et al., 2010), aunque serían necesarios otro tipo de estudios para poder determinar el mecanismo por el cual el HT está ejerciendo este efecto en las células MO y no en las NM. La única diferencia entre ambos grupos es el perfil lipídico de la membrana, lo que sugiere un papel modulador del perfil lipídico de membrana en el efecto del HT.

Como estudiaremos en los siguientes apartados, la actuación del HT en estas membranas no siempre mantiene el mismo patrón, actuando como anti o como prooxidante, dependiendo de las condiciones celulares.

### *Mecanismo de muerte celular*

Al igual que en el grupo NMHT, las células AR42J con membranas modificadas con ácido oleico mostraron un porcentaje de células vivas mayor en presencia de HT. Posiblemente se deba al mismo efecto antioxidante que comentamos en el apartado referente a las células AR42J con membranas sin modificar (ver pág. 209). Sin embargo, a nivel de funcionalidad mitocondrial, el grupo MOHT según el ensayo de MTT, presenta una viabilidad significativamente menor al grupo MO. Esto indica que aunque la función mitocondrial disminuya con la presencia de HT, a nivel de membrana no se observan cambios. Posiblemente sea un problema temporal, donde la mitocondria esté revelando un daño temprano en este tipo de células, que aún no se ha expresado a nivel de membrana, o simplemente, este daño mitocondrial no acontece con una alteración de la membrana plasmática.

Respecto al tratamiento con hidroxitirosol, son varios los estudios que hablan del carácter oxidante-prooxidante de los polifenoles en general, y de este compuesto en concreto, dependiendo del estado oxidativo de la célula. Este efecto paradójico parece estar relacionado con la generación de ERO a través del ciclo redox hidroquinona/quinona, un proceso ampliamente estudiado en quinonas xenobióticas aromáticas y sus aductos de Michael (Murty et al., 1992; Penning et al., 1999). Algunos estudios han observado un efecto prooxidante cuando el hidroxitirosol se administra a concentraciones bajas (Briante et al., 2004). Sin embargo, otros muestran un efecto prooxidante como consecuencia de altas concentraciones de estos compuesto fenólicos, conocidos por su acción antioxidante (Elbling et al., 2005). Por otra parte, se ha relacionado este efecto prooxidante a través de la actividad reductora de los iones hierro y cobre, ya que estos metales reducidos pueden catalizar la producción de radicales  $\text{OH}\cdot$  mediante la reacción de *Fenton* (Koopenol, 1993; Tadolini et al., 1997). En resumen, la actividad prooxidante de los compuesto fenólicos que se ha observado bajo ciertas condiciones, ha levantado mucha cautela en el consumo de grandes cantidades de estos compuesto (Lambert et al., 2007; Yi et al., 2009) o de una larga prolongación en el tiempo (Morita et al., 2009).

Como se comentó anteriormente, tras varios ensayos de MTT con diferentes concentraciones de hidroxitirosol, resultó ser la dosis 50  $\mu\text{M}$  la que mostró menor citotoxicidad en todos los grupos experimentales. Fue por este motivo por lo que eligió dicha concentración como la dosis adecuada. No obstante, los resultados obtenidos muestran un comportamiento del HT muy diferente dependiendo del perfil an ácidos grasos de la membrana. De hecho, el grupo de células no modificadas tratadas con hidroxitirosol, NMHT, mostró un ligero aumento de la viabilidad, respecto al grupo NM. Sin embargo, en el grupo de células modificadas con ácido oleico, el tratamiento con HT disminuyó significativamente su viabilidad. Son varios los autores los que sugieren una acción pleiotrópica de estos polifenoles en la modulación de la señalización celular y en las vías bioquímicas involucradas en supervivencia y muerte celular, dependiendo dichos efectos de la concentración del polifenol, del sistema celular, del envejecimiento, y del tipo y estado de procesos degenerativos (Gill et al., 2005; Notarnicola et al., 2011). En nuestro caso, podemos hablar de un efecto del hidroxitirosol dependiente del tipo de perfil lipídico de la membrana.

Probablemente, lo que supone una concentración de HT adecuada para el grupo NM, para el grupo MO puede ser una concentración excesiva, a causa del mejor estatus oxidativo que

le aporta el perfil lipídico rico en MUFA. Asimismo, se ha comprobado que el grupo MOHT presenta un mayor porcentaje de ERO que el grupo NMHT (resultados aun no publicados del proyecto de investigación Ref. AGL2006-05005/ALI). De modo que un aporte extra de antioxidante en estas células puede que sea innecesario y produzca un efecto prooxidante.

No obstante es importante destacar que resulta difícil elucidar un patrón estándar en el comportamiento del HT en las células AR42J diferenciadas y modificadas en su membrana con ácido oleico.

### *Funcionalidad celular*

#### Concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_c$ )

La presencia de HT en el medio de cultivo produce un ligero aumento en la  $[Ca^{2+}]_c$  basal de las células con membranas modificadas en oleico ( $150,6 \pm 11,6$  nM en MO y  $185,7 \pm 23,7$  nM en MOHT,  $n=6$ ), al igual que ocurría en el grupo NMHT. Este aumento producido por el HT posiblemente se deba al efecto que puede ejercer sobre los almacenes intracelulares en condiciones de reposo, el cual comentábamos en apartados anteriores (ver pág. 201-211)

En cuanto a la respuesta a CCK-8, el HT origina una disminución general, tanto en el IP como en el ABC (figura 43 y 44), similar a lo observado en el grupo no modificado. Sin embargo, presenta una disminución en el índice IP/ABC respecto a MO, mientras que el grupo NMHT presentaba el mismo valor que NM. Estos resultados podrían deberse al efecto prooxidante del HT en estas membranas, el cual puede estar comprometiendo la función de bombas de  $Ca^{2+}$  sensible a ERO como la PMCA, de manera que tarda más tiempo en devolver la  $[Ca^{2+}]_c$  a sus niveles basales.

Cuando comentábamos el efecto que el HT ejercía sobre la movilización de  $Ca^{2+}$  citosólico en respuesta a secretagogo, sugeríamos que probablemente se debiera al efecto de barrido que estaría ejerciendo sobre las ERO, interfiriendo en la interacción  $Ca^{2+}$ -ERO (Rivera-Barreno et al., 2010; Camello et al., 2000). En base al comportamiento prooxidante que parece mostrar el HT en este grupo, probablemente los mecanismos por los cuales este compuesto disminuye la respuesta de  $Ca^{2+}$  al secretagogo sean diferentes en función a su

actuación como anti o como prooxidante, pudiendo estar alterando las vías de señalización intracelular al actuar como agente prooxidante. No estamos en condiciones de ofrecer una respuesta a este comportamiento del HT en las células con membranas enriquecidas en ácido oleico y sería necesario llevar a cabo otro tipo de estudios para poder comprender mejor la actuación de este compuesto según el perfil lipídico de la membrana.

Es sorprendente que a pesar de que la adaptación de la membrana a ácido oleico aportaba a la célula una mayor movilización de  $Ca^{2+}$  en respuesta a CCK-8, la presencia de HT proporciona tal daño en este grupo, que hace que MOHT presente una menor respuesta a CCK-8 que el grupo NMHT. De nuevo, y al igual que lo descrito por otros autores, ponemos de manifiesto la actividad prooxidante de los compuesto polifenólicos, en concreto el HT, dependiendo de las condiciones celulares (Lambert et al., 2007; Yi et al., 2009).

## Amilasa

### **Secreción basal de amilasa**

Al igual que ocurre en el grupo NMHT, el HT produjo una disminución significativa de la secreción basal de amilasa en la células dañadas (CeMOHT) y no dañadas (MOHT). Sin embargo, no contamos con antecedentes que nos permitan discutir este hallazgo, desconociendo cuales son los mecanismos que podrían estar implicados.

### **Secreción neta de amilasa estimulada por CCK-8**

El HT aumentó significativamente la secreción neta de amilasa estimulada por todas las concentraciones de CCK-8 empleadas ( $10^{-11}$  M –  $10^{-7}$  M). Además, alteró la sensibilidad de la célula por el secretagogo, ya que la secreción máxima se originó a una concentración de CCK-8 de  $10^{-9}$  M y no de  $10^{-8}$  M como sucedía en el grupo MO, sin embargo, es importante destacar que aunque el HT evocó mayores niveles de secreción neta estimulada, la curva dosis-respuesta es igual a la del grupo NM.

Como hemos discutido anteriormente no existen estudios que nos permitan explicar cuáles son los posibles mecanismos implicados en los efectos que produce el HT sobre la secreción de amilasa neta estimulada, aunque en base a los resultados obtenidos por Rivera-Barreno y cols. (2010) podríamos suponer que este efecto es atribuido al efecto

antioxidante del HT el cual neutralizaría las ERO generadas por CCK-8. Aunque antes hemos defendido su actuación como prooxidante en otros procesos celulares.

## ***Efecto del HT en el tratamiento con Ceruleina***

### *Respuesta inflamatoria*

En cuanto a la activación del NFκ-B observamos que sorprendentemente, la presencia de HT en el tratamiento con ceruleina  $10^{-8}$  M, en lugar de disminuir dicha activación como ocurría en las células no modificadas, se produce una mayor activación respecto al grupo CeMO. Esta activación se observa con un aumento en los niveles nucleares de p65 (figura 23), acompañado de una disminución en la concentración citosólica de IκBα (figura 21). Si recordamos, ni el tratamiento con HT ni con ceruleina  $10^{-8}$  M indujeron una activación de dicho factor, y sin embargo, sí el tratamiento conjunto, posiblemente por una potenciación entre ambos compuestos.

Según los parámetros anteriormente comentados, en la actuación del HT parece existir una modulación dependiendo del perfil lipídico de las membranas, de modo que en las enriquecidas en MUFA, mucho más resistentes al daño oxidativo (Quiles et al., 2006; Bello et al., 2006), parece actuar como prooxidante, desencadenando un daño oxidativo. Probablemente, durante la incubación con HT, 2 h antes de la adición de la ceruleina  $10^{-8}$  M, este compuesto aumenta la generación de ERO pero no consigue activar al NF-κB, y al añadir la ceruleina  $10^{-8}$  M, que a su vez aumenta el daño oxidativo (Yu et al., 2002), ambos efectos se potencian y resulta en la degradación de IκBα, y posterior paso de la subunidad p65 al núcleo. No obstante, este aumento en la activación del NF-κB no se traduce en una mayor producción de IL-6 (tabla 16). Incluso la relación IL-10/IL-6 es mayor que la que se observaba en el grupo MOHT. Posiblemente por un efecto a nivel transcripcional, por lo que sería conveniente la determinación de niveles de de ARNm, o incluso la activación de otros factores de transcripción.

### *Mecanismos de muerte celular*



El ensayo de apoptosis/necrosis ha demostrado una gran estabilidad en las membranas enriquecidas en MUFA, de manera que el tratamiento con ceruleína no produjo una disminución en el porcentaje de células vivas, ni a la concentración  $10^{-8}$  M ni  $10^{-7}$  M. Por otro lado, la presencia de HT ejerció un efecto positivo mostrando el grupo MOHT un mayor número de células vivas. En cuanto al efecto que tiene la presencia de HT en el tratamiento con ceruleína, observamos que el grupo Ce-8MOHT presenta un número de células vivas similar al grupo MOHT, aunque un mayor porcentaje de apoptosis. Sin embargo, el grupo Ce-7MOHT se asemeja más al grupo Ce-7MO, en lugar de al Ce-7MOHT, lo que sugiere que en relación con la integridad de membrana el HT mantiene su efecto antioxidante frente a la concentración  $10^{-8}$  M pero no para la  $10^{-7}$  M.

No obstante, la función mitocondrial es muy diferente en estos grupos. El ensayo de MTT reveló que así como la ceruleína  $10^{-8}$  M no disminuye dicha función, el tratamiento conjunto con HT produjo una fuerte decremento, incluso mayor al que se observó con el HT (figura 38), probablemente por un efecto prooxidante del HT potenciado con la presencia de ceruleína, como observamos en la activación del NF-kB. Sin embargo, en el caso de la concentración  $10^{-7}$  M, la cual si que indujo una disminución en la función mitocondrial, la presencia del HT produce un gran aumento en la viabilidad.

Se observó por tanto un efecto antagónico del HT en ausencia o en presencia de la ceruleína  $10^{-7}$  M. En ausencia de ceruleína  $10^{-7}$  M, el tratamiento con hidroxitirosol disminuye significativamente la viabilidad respecto a las células MO, mientras que en presencia de dicha concentración de ceruleína, ejerce un efecto en sentido contrario, aumentando la viabilidad hasta alcanzar valores similares al grupo MO. Parece ser que las membranas oleico, al ser más estables ante al daño oxidativo por presentar menor índice de poliinsaturación, en condiciones normales, el HT actúa como prooxidante. Sin embargo, al inducirles un daño con ceruleína  $10^{-7}$  M, el HT actuaría como antioxidante y aumentaría la viabilidad celular. De hecho, en el caso de la ceruleína  $10^{-8}$  M, donde la membrana puede ejercer un efecto protector, la presencia del hidroxitirosol no mostró una recuperación, sino que se obtuvieron valores significativamente menores, sugiriendo una acción prooxidante, o al menos neutra, en lugar de antioxidante. Probablemente debido a un desequilibrio entre la concentración del hidroxitirosol y el estrés oxidativo, dando lugar a la formación de quinonas que participen en los ciclos redox, actuando como prooxidantes (Bors et al., 2000).

De este modo, en nuestro estudio se ha observado un efecto citotóxico, por parte del HT, en aquellos casos donde la célula no necesitaba un suplemento antioxidante, y un efecto beneficioso por parte de este compuesto, cuando la célula se encontraba en situación de requerir dicho suplemento. Así pues, en las células enriquecidas en ácido oleico, en aquellos casos donde la membrana podía ejercer un efecto protector ante el daño oxidativo, el hidroxitirosol actuó como prooxidante. Mientras que cuando se le aplicaba un daño, donde el tipo de perfil lipídico de la membrana no podía proteger, como es el caso de células no modificadas, o incluso modificadas en ácido oleico pero dañadas con ceruleina  $10^{-7}$  M, el hidroxitirosol sí actuó como antioxidante y mejoró la viabilidad de estas células.

Con respecto al daño ejercido, puede ser, desde el mismo medio de cultivo convencional que produzca un estrés oxidativo (Leist et al., 1996) hasta una hiperestimulación con ceruleina (Ferreira et al., 2002; Ju et al., 2011)

### *Funcionalidad celular*

#### Concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_c$ )

El tratamiento previo con HT, y la presencia del mismo durante el tratamiento con ceruleina  $10^{-8}$  M, en células AR42J diferenciadas y con membranas modificadas con ácido oleico, evita la marcada disminución en la  $[Ca^{2+}]_c$  basal que produce esta concentración de ceruleina en este grupo. Así, el grupo CeMOHT presenta una concentración basal ligeramente superior a la del grupo CeMO ( $147,5 \pm 30,3$  y  $104,25 \pm 10,5$  nM, respectivamente,  $n=6$ ). Posiblemente se deba a un efecto del HT sobre los almacenes intracelulares (Palmerini et al., 2005; Castillo-vaquero et al., 2010), al igual que hemos observado en el grupo de células con membranas sin modificar, indicando que el posible daño de la ceruleina no interfiere en esta acción del HT. Sin embargo, la respuesta al secretagogo no se recupera con el tratamiento previo de HT, posiblemente porque en este tipo de perfil lipídico de membrana el HT se esté comportando como prooxidante, o a la existencia de una interacción entre ambos compuestos como se comprueba con el análisis factorial, tanto en el IP ( $P=0,000$ ), en el ABC ( $P=0,001$ ), como en el índice IP/ABC ( $P=0,036$ ). A la vista de los resultados, esta interacción parece ser sinérgica.

Con todo, se pone de manifiesto un relación entre la actuación del HT y el tipo de perfil lipídico en cuanto a la movilización de  $Ca^{2+}$  citosólico en respuesta a secretagogo, lo que se

confirma con los resultados obtenidos a través del análisis factorial tanto en la primera etapa de la curva, IP ( $P=0,001$ ), como en el ABC ( $P=0,04$ ).

## Amilasa

En las células cuyas membranas se enriquecieron en ácido oleico y se les indujo un daño con ceruleína  $10^{-8}$  M, el tratamiento previo con HT (CeMOHT), también aumentó la secreción neta de amilasa estimulada por CCK-8, pero en este caso a todas las concentraciones. Al igual que en el grupo NM, el HT aumentó la secreción estimulada pero en menor proporción a como lo hizo en el grupo MOHT, además el HT fue capaz de prevenir el deterioro que la ceruleína produjo sobre los mecanismos de secreción de amilasa estimulada, ya que recuperó los niveles de secreción que se observaron en las células del grupo MO, aunque la secreción estimulada siguió siendo más baja que en grupo NM. En relación a la sensibilidad de las células por el secretagogo, el HT no provocó una alteración.

## **Modelo de Pancreatitis Aguda en células AR42J diferenciadas con membranas enriquecidas en PUFA n-3**

### *Efecto del ácido graso*

#### *Respuesta inflamatoria*

Al igual que ocurría en el grupo MO, la presencia de EPA/DHA en el medio, o incluso la propia adaptación de las membranas a éstos ácidos grasos n-3, no origina una respuesta inflamatoria. No existen diferencias significativas ni en la activación del NF- $\kappa$ B, ni en la producción de mediadores inflamatorios, entre los grupos NM y Mn-3 (figuras 20, 22 y 25)

Estos datos nos sugieren que la modificación de las membranas como tal, bien sea en MUFA como PUFA n-3, no modifica la respuesta inflamatoria en ausencia de un agente nocivo como ceruleína. De modo que la propia manipulación de la membrana no

desencadena una respuesta inflamatoria. Esto indica que las diferencias en estos parámetros que se observan ante los diferentes tratamientos, en cada uno de los grupos estudiados, se debe principalmente a la modificación del perfil lipídico.

### *Mecanismos de muerte celular*

Los ensayos de apoptosis/necrosis y MTT, revelan que el grupo Mn-3 presenta un menor porcentaje de viabilidad respecto a NM, al igual que ocurría con el grupo MO. Probablemente por la presencia de ácidos grasos libres en el medio, al no haberse acomplejado en su totalidad con la albúmina (ver pág. 219-220).

Este grupo presenta un mayor porcentaje de apoptosis que el grupo NM, disminuyendo por tanto la muerte por necrosis. Estos resultados coinciden con lo observado por otros autores que apuntan a los PUFAs n-3 como coadyuvantes no tóxico en el tratamiento del cáncer, puesto que además de inhibir la proliferación celular aumentan la apoptosis en células cancerosas, a través de su incorporación en la membrana plasmática (Corsetto et al., 2011; Schley et al., 2007).

Estos efectos se han asociado con el enriquecimiento de los *rafts* lipídicos de membrana en PUFAs n-3, así Schley y colaboradores (2007), demostraron que el EPA y DHA se incorporan en los *rafts* lipídicos de células humanas de cáncer de mama, MDA-MB-231, reemplazando la esfingomielina, colesterol y DAG, disminuyendo los niveles del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) dentro de los *rafts* y aumentando la fosforilación tanto de dicho factor como de p38 MAPK, lo que se asoció con una disminución del crecimiento y la inducción de la apoptosis. La imagen general que muestran estos autores es que al incorporarse los PUFA n-3 activan la esfingomielinasa neutra que hidroliza la esfingomielina y genera ceramidas, que a su vez son una señal proapoptótica, que junto con la fosforilación del ECFR genera más señales proapoptóticas, y desencadenan un aumento de apoptosis, quizá a través de p38 MAPK.

### *Funcionalidad celular*

#### Concentración citosólica de calcio

Nuestros resultados muestran que la modificación de la membrana con PUFA n-3 no modifica la  $[Ca^{2+}]_c$  basal, ya que el grupo Mn-3 muestra concentraciones basales similares al grupo NM, lo que nos sugiere que los sistemas encargados de mantener esta concentración basal (SERCA y PMCA) no parecen alterarse con esta modificación. Sin embargo, si analizamos la curva de evolución temporal en respuesta a CCK-8, observamos que aunque no hay diferencias en el IP, lo que nos indica que la salida de  $Ca^{2+}$  desde los almacenes intracelulares es similar en ambos casos, el ABC es menor en el grupo Mn-3, y como resultado el índice IP/ABC es mayor. Esto nos sugiere que el enriquecimiento de la membrana en PUFA n-3 no interfiere en la respuesta a corto plazo, mediada esencialmente por  $IP_3$  (Petersen et al., 2009) puesto que los IP son iguales, sino en la respuesta a largo plazo, donde el grupo Mn-3, muestra mayor eficacia en los mecanismos de recaptación y extrusión de calcio.

En estudios llevados a cabo por nuestro grupo, se observó que a diferencia de lo que ocurre en este caso con las células enriquecidas en PUFAs n-3, las células AR42J diferenciadas y con membranas modificadas con ácidos grasos poliinsaturados n-6, concretamente linoleico (C18:2 n-6), el ABC es mayor que en las no modificadas (Audi, 2008), lo que sugiere que la respuesta a largo plazo parece afectarse por la calidad de la grasa y no por la poliinsaturación.

El hecho de que el índice IP/ABC sea mayor en el grupo Mn-3 indica que los niveles de  $Ca^{2+}$  son menos sostenidos en el tiempo que en el grupo NM, lo que sería beneficioso para la célula, disminuyendo la activación de todas las señales que dependen de esa  $[Ca^{2+}]_c$  aumentada y sostenida (Han y Logsdon, 2000; Raraty et al., 2000; Petersen et al., 2009).

## Secreción de Amilasa

### Secreción basal de amilasa

La secreción basal de amilasa de las células AR42J diferenciadas cuyas membranas se modificaron con PUFAs n-3 disminuyó significativamente en comparación con el grupo NM, sin embargo, este efecto fue menos pronunciado que en el grupo MO. Los mecanismos involucrados en este hecho no son del todo conocidos, pero al igual que ocurría con la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, parece influenciarse por la calidad de la grasa, ya que difiere de los resultados obtenidos, por nuestro grupo, en células acinares de ratas alimentadas con una dieta rica en aceite de girasol.

### Secreción neta de amilasa estimulada por CCK-8

En el grupo Mn-3 la secreción de amilasa neta estimulada por concentraciones crecientes de CCK-8 disminuye notablemente frente al grupo NM. El enriquecimiento de las membranas en PUFAs n-3 afecta los mecanismos secretores enzimáticos de las células notablemente. A concentraciones de CCK-8  $\geq 10^{-8}$  M la secreción de amilasa de este grupo fue significativamente menor que la del grupo NM. Además, no se observó la respuesta concentración-dependiente, no se indujo la típica curva dosis-respuesta.

No sabemos con exactitud cuáles son los mecanismos implicados en este hecho, sabemos que no se relacionan con alteraciones en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, ni con una respuesta inflamatoria ya que la modificación de la membrana con PUFA n-3 no produjo alteraciones en estos parámetros, como vimos anteriormente. Hay estudios que relacionan que el tipo de muerte celular estarían relacionadas con una mayor secreción de amilasa (Liang *et al.*, 2008), sin embargo, estas células presentaron una mayor proporción de apoptosis que de necrosis.

No hay que descartar que la propia modificación de la membrana puede estar alterando la composición de los *rafts* lipídicos, ya que se ha observado una asociación entre el enriquecimiento en PUFA n-3 de estos de microdominios y la modulación de mecanismos de señalización intracelular (Li *et al.*, 2006).

## ***Efecto de la ceruleina***

### *Respuesta inflamatoria*

A diferencia de lo que observábamos en el grupo de células no modificadas, el tratamiento con ceruleina  $10^{-8}$  M, no indujo una respuesta inflamatoria en las células con membranas enriquecidas en PUFA-n3, de manera que el grupo CeMn-3 presentó valores similares al grupo Mn-3 tanto a nivel de la activación del NF-kB como en producción de mediadores inflamatorios.

Se ha observado que los PUFA n-3 de cadena larga pueden ejercer un efecto antiinflamatorio, reduciendo la expresión de citocinas proinflamatorias, en varias afecciones inflamatorias crónicas. De hecho, son varios los estudios que han observado un efecto antiinflamatorio de los PUFAs n-3 en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide (Geusens et al., 1994), asma (Broughton et al., 1997), enfermedad de Crohn (Belluzzi et al., 1996) y psoriasis (Mayser et al., 1998), apreciando un alivio en los síntomas de cada una de las enfermedades. La acción antiinflamatoria de estos PUFAs n-3 puede ser directa, a través de su acción sobre factores de transcripción influyendo en la expresión de genes, o mediada por la producción de eicosanoides.

La ingesta de EPA/DHA reemplaza parcialmente los ácidos grasos n-6, particularmente el AA, en las membranas celulares. De hecho en nuestro caso, el grupo Mn-3 presenta un contenido significativamente menor de AA respecto a NM. Esta composición de las membranas celulares influye en el metabolismo de los eicosanoides, los cuales están involucrados en la modulación de la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria (Calder et al., 2006), ya que el EPA y DHA, como comentamos en el apartado de antecedentes, son sustratos competitivos de las enzimas y productos del metabolismo del AA. De modo que el EPA puede competir con el AA por las ciclooxigenasas y lipoxigenasas dando lugar a prostanoideos de las series 3 (PGE3, PGF3, TXA3, TXB3, PGI3) y 5 (LTB5, LTC5, LTD5, LTE5), menos activos que los de las series 2 y 4 procedentes del AA. Este es uno de los motivos por los que es tan importante el balance entre la ingesta de ácidos grasos n-3 y n-6 (Mataix y Gil, 2002).

Por otro lado, los PUFAs n-3 pueden modular la expresión de genes en diferentes organismos por la regulación de factores de transcripción como PPAR (Jump et al., 2002; Schmitz et al., 2008), siendo los PUFAs n-3 unos potentes activadores de estos factores de transcripción. La activación de PPAR inhibe la expresión de genes inflamatorios como el del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y COX-2, entre otros (Jiang et al., 1998; Xu et al., 2001). Los mecanismos antiinflamatorios de los PPAR pueden ser, estimulando una regulación a la baja de eicosanoides inflamatorios a través de la inducción de  $\beta$ -oxidación peroxisomal o bien interfiriendo y/o antagonizando la activación de otros factores de transcripción como el NF-kB (Chinetti et al., 2000; Delerive et al., 2001).

No obstante los PUFAs también pueden regular la actividad del NF-kB directamente. Xu y colaboradores (2001) demostraron que el pretratamiento en el medio de cultivo con EPA/DHA disminuyó la producción de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6 en macrófagos THP-1, comparados con las células controles. Asimismo, Alhan y colaboradores (2006) observaron que el uso de PUFAS n-3 en ratas con pancreatitis necrotizante produjo una disminución en los niveles de IL-6. En nuestro caso, también hemos podido comprobar este efecto de los PUFAs n-3 ya que la producción de IL-6 en el grupo CeMn-3 es significativamente menor que en el grupo CeNM ( $P < 0,05$ ). También se ha demostrado que el DHA es capaz de disminuir la expresión del factor nuclear p65 e incrementar la expresión de inhibidores citosólico del NF-kB, además de regular negativamente la unión de dicho factor de transcripción con el DNA (Xu et al., 2001; Weldon et al., 2006). Esto explicaría, por un lado la no activación del NF-kB que presenta el grupo CeMn-3, y por otro, el hecho de que este grupo presente una concentración citoplasmática significativamente mayor de I $\kappa$ B $\alpha$  respecto a CeNM ( $P < 0,05$ ), y unos niveles nucleares de p65 significativamente menores al grupo CeNM ( $P < 0,05$ ).

### *Mecanismo de muerte celular*

#### Apoptosis/Necrosis

Nuestros resultados muestran un cierto efecto protector de la membrana frente al daño que produce el tratamiento con ceruleina. De modo que a la concentración de ceruleina  $10^{-8}$  M no se observa una disminución en el porcentaje de células vivas, a diferencia de lo que se



observaba en el grupo Ce-8NM (figura 31), es a la concentración  $10^{-7}$  M cuando se aprecia esa disminución en las células con membranas enriquecidas en PUFA n-3.

En principio, se podría pensar que al tener un mayor contenido de PUFA en sus membranas, las células podrían ser más susceptibles de sufrir un daño oxidativo debido a la reactividad relativa que presentan los átomos de hidrógeno bis-alílicos que se encuentran entre los dobles enlaces del ácido graso (Horton et al., 1987). Sin embargo la relación existente entre la ausencia de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares y la susceptibilidad a sufrir oxidación es compleja. Por ejemplo se ha demostrado que la suplementación del medio de cultivo con C18:2n-6 y C18:3n-6 protege a las células endoteliales del daño producido por  $H_2O_2$  mejor que la suplementación con C18:1 n-9 (Karman et al., 1997). Por otro lado, está cada vez más claro que los PUFA n-3 pueden actuar como pro y antioxidantes dependiendo de las condiciones experimentales y de la dosis administrada. Calzada y colaboradores (1992), demostraron que concentraciones bajas de 20:5 n-3 puede normalizar los niveles de vitamina E y peroxidación en plaquetas en un modelo *in vitro* de estrés oxidativo. Asimismo, Bechoua y colaboradores (1999) observaron un efecto protector del DHA frente a las alteraciones inducidas por el  $H_2O_2$  en un cultivo de linfocitos. En nuestro caso, pudimos comprobar que aunque la ceruleína  $10^{-8}$  M desencadena un aumento de ERO en estas células, no se aprecia una mayor cantidad de 8-isprostano, considerado un marcador de peroxidación lipídica, y sí un aumento de GSH (resultados aun no publicados del proyecto de investigación Ref. AGL2006-05005/ALI).

Probablemente la propia membrana enriquecida en PUFA está protegiendo a la célula frente al daño oxidativo de la ceruleína  $10^{-8}$  M favoreciendo la regeneración de GSH. Sin embargo, al forzar la concentración, el estrés oxidativo sería mayor, sobrepasaría la posible capacidad antioxidante de la membrana y se dañaría la célula resultando en esa disminución en el número de células vivas que presenta el grupo Ce-7Mn-3 frente a Mn-3.

No obstante, aunque en el grupo Ce-7Mn-3 se haya observado una disminución en las células vivas, existe un predominio de apoptosis frente necrosis, de manera que si comparamos el índice apoptosis/necrosis en este grupo respecto a los grupos Ce-8NM y Ce-7NM, podemos comprobar que es significativamente mayor en el grupo Ce-7Mn-3, lo que sugiere un efecto protector de este perfil de membrana, enriquecido en PUFA n-3, frente a la gravedad de la enfermedad, en este modelo *in vitro* de pancreatitis aguda respecto a los grupos de células con membranas no modificadas.

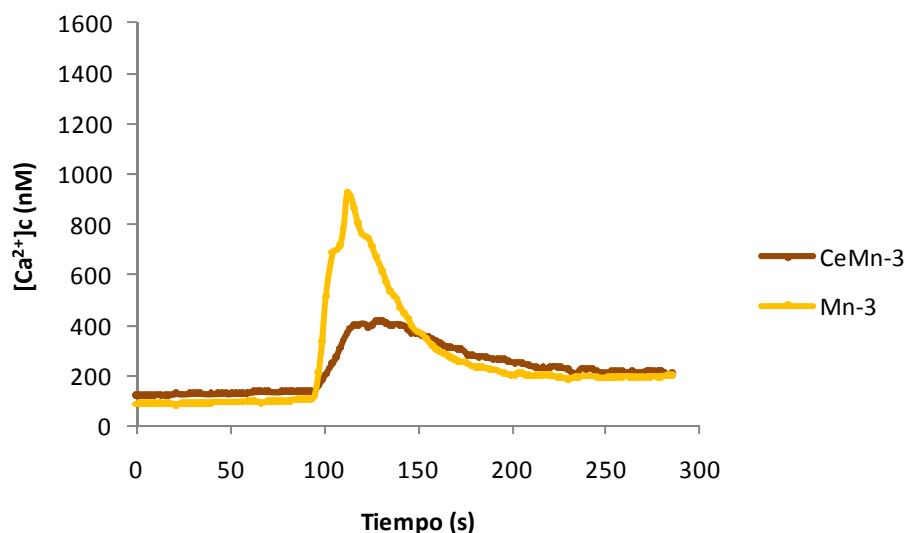
## MTT

El ensayo de MTT, a diferencia del de apoptosis/necrosis puso de manifiesto un efecto citotóxico de la ceruleína en estas células, observando una disminución de la viabilidad en los grupos Ce-8Mn-3 y Ce-7Mn-3, reflejo de la disfunción mitocondrial (figura 38). Como ya hemos comentado en otras ocasiones, posiblemente se deba a la expresión de un daño temprano que aún no se ha manifestado a nivel de membrana en el caso de la concentración  $10^{-8}$  M, probablemente retardado por el efecto antioxidante de los PUFAs n-3 que se mencionaba antes.

## *Funcionalidad celular*

### Concentración citosólica de calcio

Como se observa en nuestros resultados (figura 58), la respuesta de  $Ca^{2+}$  frente a CCK-8 en este grupo se encuentra alterada en presencia de ceruleína  $10^{-8}$  M, tanto en la primera parte de la curva, IP, como en la extrusión y recaptación de  $Ca^{2+}$ , manteniendo mucho más sostenida en el tiempo la  $[Ca^{2+}]_c$  (figura 45). Esta alteración es similar a la que se observó en el grupo CeNM, formando parte del daño que ejerce la ceruleína sobre la respuesta funcional de este ion ante CCK-8 (ver pág. 202). Sin embargo, aunque ambas respuestas se encuentran alteradas, si comparamos los grupos CeNM y CeMn-3 observamos que la relación IP/AUC es mayor en este último grupo, indicando que los mecanismos de recaptación y extrusión están mejor en las membranas enriquecidas en PUFAs n-3. Probablemente se deba al enriquecimiento en estos ácidos grasos ya que cuando comparábamos el efecto de la modificación de la membrana, observábamos que estos mecanismos eran mejores en este grupo (figura 41), lo que sugiere que dicha modificación contrarresta el daño de la ceruleína.



**Figura 58.** Curvas de evolución temporal de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ), en respuesta a CCK-8 ( $10^{-9}$  M), en células AR42J diferenciadas con dexametasona (100 nM), con membranas modificadas en PUFAs n-3, tratadas con ceruleína ( $10^{-8}$  M) durante 24 horas (CeMn-3; línea oscura), y sin tratar (Mn-3; línea clara). Los valores están expresados como valores medios ( $n=6$  en cada grupo, y pertenecientes al menos de tres lotes diferentes de células).

Los efectos de la modificación de la membrana en este grupo podría deberse al enriquecimiento de los *rafts* lipídicos en estos ácidos grasos, ya que se ha demostrado una clara asociación entre estos microambientes de membrana y los mecanismos de señalización intracelular (Harder et al., 2004). Al tratarse de microdominios enriquecidos en proteínas unidas a glicosilfosfatidilinositol y proteínas de señalización, y al ser potencialmente modificables por la dieta, particularmente por los ácidos grasos dietéticos, presentan por tanto un papel importante en la transducción de la señal (Shaw et al., 2006) y su modificación por a la dieta. Asimismo, se ha relacionado el enriquecimiento de los *rafts* lipídicos en PUFAs n-3, concretamente EPA y DHA, con alteraciones en la señalización intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Yaqoob et al., 2009). Por lo que posiblemente, las diferencias existentes entre el grupo NM y Mn-3, y el efecto de la ceruleína en ambos, se deban a este enriquecimiento.

## Amilasa

### Secreción basal de amilasa

La ceruleína  $10^{-8}$  M produce un aumento significativo de la secreción basal de amilasa en el grupo CeMn-3. Esto concuerda con la típica respuesta que se produce en modelos de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en ratas, en donde la secreción basal de amilasa se encuentra aumentada (Bragado *et al.*, 1996).

### **Secreción neta de amilasa estimulada por CCK-8**

En células cuyas membranas han sido modificadas con PUFAs n-3, la ceruleína (CeMn-3) disminuye la secreción neta estimulada, pero esta disminución sólo es significativa a concentraciones de CCK-8 de  $10^{-11}$  y  $10^{-10}$  M. Los mecanismos involucrados en la secreción de amilasa están tan dañados que la no responde al secretagogo, por lo que la respuesta concentración-dependiente se ha perdido. Esto se correlaciona con las alteraciones producidas por la ceruleína en este grupo sobre los mecanismos que intervienen en la respuesta de  $Ca^{2+}$  frente a CCK-8. Como vimos, tanto la liberación desde los almacenes intracelulares como los mecanismos de recaptación y extrusión de calcio estaban alterados.

### ***Efecto del HT***

A la vista de los resultados obtenidos en este grupo, el HT parece ejercer un efecto similar al que presentaba en el grupo NM (ver pág. 208-213).

Como podemos observar, la presencia de HT en las células enriquecidas en PUFAs n-3 no desencadena una respuesta inflamatoria, mostrando el grupo Mn-3HT valores similares al grupo Mn-3 tanto en la activación del NF-kB como en la producción de citocinas inflamatorias (figura 25).

Respecto al efecto sobre los mecanismos de muerte celular, el HT ha demostrado tener un efecto positivo, aumentando el porcentaje de células vivas probablemente atribuible al efecto antioxidante de este compuesto en el medio de cultivo, como vimos en el grupo NM (ver pág. 209). Al igual que ocurría en las células con membranas sin modificar, el HT no ejerce un daño a nivel mitocondrial, presentado una viabilidad similar los grupos Mn-3 y Mn-3HT.

En cuanto al efecto sobre la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, el HT tienen un comportamiento similar al que presentó en el grupo NM, produciendo una disminución en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares tras la estimulación con CCK-8 (figura 43), lo que sugiere que el efecto del HT sobre los almacenes intracelulares (Palmerini et al., 2005) no depende del perfil lipídico de la membrana (ver pág. 210-211).

La presencia de HT en el grupo Mn-3, al igual que en los grupos NM y MO, disminuyó la secreción basal de amilasa. Como hemos mencionado antes desconocemos los mecanismos implicados, ya que de acuerdo a nuestros resultados y en base a los antecedentes no podemos dar una explicación a este hallazgo. Aunque hay que mencionar que independientemente del tipo de membrana, el HT siempre produjo el mismo efecto.

Al contrario de lo que ocurre con la secreción basal, el HT produjo un aumento significativo de la secreción neta de amilasa estimulada por concentraciones de CCK-8  $\geq 10^{-10}$  M en el grupo Mn-3HT. A pesar de que los mecanismos secretores del grupo Mn-3 estaban alterados, el HT fue capaz de revertir el efecto producido por la propia modificación de la membrana. Es interesante destacar como el HT, independientemente del tipo de membrana, es capaz de estimular la secreción de amilasa inducida por CCK-8. Interesantemente, los resultados indican que HT tiene un efecto secretagogo, no hay que olvidar que es un metabolito endógeno de la dopamina (De la Torre, 2008) y se ha demostrado *in vitro* en células acinares pancreáticas de cobayas (Bao *et al.*, 1988) que la dopamina es capaz de producir un pequeño, pero significativo, aumento de la secreción de amilasa estimulada. Podríamos especular que se podría producir un efecto sinérgico de HT y de la CCK-8 sobre la secreción de amilasa.

El hecho de que el HT muestre una acción similar a la observada en el grupo NM indica que en ausencia de un agente nocivo, el perfil lipídico que muestra el grupo Mn-3 no interfiere en la actuación de dicho compuesto. Teniendo en cuenta que la acción de los polifenoles, como el HT, depende de varios factores como la morfología de la célula, el tipo de sistema celular, el envejecimiento y el tipo o estado de proceso degenerativo, entre otros (Gill et al., 2005; Hamdi et al., 2005; Perona et al., 2006), parece indicar que probablemente el ambiente celular que proporciona este perfil lipídico, en ausencia de ceruleína, sea similar al del grupo NM. De hecho, tanto el grupo NM y Mn-3 presentan valores similares de ERO y 8-isoprostano (resultados aun no publicados del proyecto de investigación Ref. AGL2006-05005/ALI).

### ***Efecto del HT en el tratamiento con Ceruleina***

En cuanto al efecto de la presencia de HT en las células tratadas con ceruleina, puesto que en las células con este perfil lipídico se observó una inhibición de la respuesta inflamatoria que induce la ceruleina, el tratamiento preventivo con HT no supone un cambio en esta respuesta, mostrando valores similares el grupo CeMn-3 y Mn-3.

Respecto al efecto sobre los mecanismos de muerte celular, para la ceruleina  $10^{-8}$  M, que no produjo un daño a nivel de membrana, la presencia de HT no produce cambios. Sin embargo para la ceruleina  $10^{-7}$  M, la cual sí que indujo una disminución en el porcentaje de células vivas, el tratamiento previo con HT y la presencia de este durante el tratamiento con ceruleina sí previene del daño, observando un aumento en el número de células vivas en el grupo Ce-7Mn-3. Asimismo, el tratamiento previo con HT disminuye el daño producido por la ceruleina en la función mitocondrial probablemente atribuible al efecto de barrido de ERO, mostrando los grupos Ce-8Mn-3HT y Ce-7Mn-3HT un porcentaje de viabilidad mayor (figura 38) según el ensayo de MTT. Estos resultados junto con los obtenidos en la respuesta inflamatoria ponen de manifiesto que en presencia de ceruleina, el HT ejerce un efecto preventivo en los casos donde la ceruleina produce un daño, al igual de lo mostrado en el grupo NM.

En cuanto a la movilización de  $Ca^{2+}$  citosólico en respuesta a CCK-8, la alteración que causa la ceruleina no puede evitarse con la presencia del HT. Posiblemente se deba a que la modificación del perfil lipídico esté impidiendo la actuación del HT a este nivel, o que se esté favoreciendo una interacción entre el HT y la ceruleina que esté alterando la señalización intracelular de calcio, ya que la secreción de amilasa sí es capaz de restaurarla. Lo que confirma, de nuevo, que el efecto del HT es dependiente del perfil lipídico de membrana.

El tratamiento previo con HT en el grupo CeMn-3 (CeMn-3HT) aumentó los niveles de secreción de amilasa estimulada, incluso, por encima de los niveles observados en el grupo Mn-3.

## Efecto del tipo de Perfil Lipídico de la membrana

Hasta el momento hemos ido discutiendo el efecto que tiene la modificación del perfil lipídico inducida por la presencia de ácido oleico o PUFAs n-3 de cadena larga sobre los mecanismos celulares relacionados con la respuesta inflamatoria y la repercusión en la funcionalidad celular en un modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleina, siempre comparándolo con el modelo control cuyas membranas no están modificadas por la presencia de ningún ácido graso.

En este apartado pretendemos discutir los efectos diferenciales que la inducción de un daño con ceruleina tiene sobre los procesos inflamatorios, la muerte y la función en células cuya membrana se ha modificado con MUFAS (ácido oleico) y las que se modificaron por adición de PUFAS n-3 de cadena larga (EPA/DHA).

El análisis de membranas reveló que la diferencia fundamental entre ambos grupos es el alto contenido en MUFAS que presenta las modificadas con ácido oleico oleico y el alto contenido en PUFAs, especialmente PUFAs n-3 que presentan las modificadas con la mezcla EPA/DHA, además de diferencias en el contenido de SFA y UFA (figura 18). Como podemos observar dos tipos de perfil lipídico muy diferentes.

Ambos grupos, en ausencia de ceruleina y HT, no mostraron diferencias entre sí en el estado inflamatorio. Sin embargo, sí se apreciaron diferencias en los mecanismo de muerte celular, predominando la muerte por apoptosis en el grupo Mn-3 frente al grupo MO, posiblemente por el efecto apoptótico que presentan los PUFAs n-3 como se ha descrito en células cancerosas y que comentábamos en apartados anteriores (ver pág. 239), aunque cabe destacar que el porcentaje de células vivas es el mismo en ambos grupos. A través del ensayo MTT se puso de manifiesto una disminución de la viabilidad para ambos grupos respecto al grupo NM, lo que explicábamos como un posible efecto de la presencia de ácidos grasos que no se hayan acomplejado en su totalidad con la albúmina y estuvieran ejerciendo un efecto citotóxico como habían observado otros autores (Zhou et al., 2009; Campoio et al., 2011). Las diferencias en la movilización de  $Ca^{2+}$  en respuesta a CCK-8 que aparecen entre ambos grupos, mayor concentración basal de  $Ca^{2+}$  citosólico y ABC en MO, son las misma que presentaba este grupo frente a NM, lo que indica que se debe al enriquecimiento en estos ácidos grasos en concreto y no a la modificación en sí, ya que el grupo Mn-3 no mostraba diferencias con NM. Asimismo, Yago y colaboradores (2004) en

un estudio llevado a cabo en ratas alimentadas con una dieta rica en aceite de oliva (OO) y otras con una dieta rica en aceite de girasol (SO), observaron que las células acinares del grupo OO mostraron una mayor respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  a CCK-8, junto con una mayor secreción de amilasa. En base a nuestros resultados apreciamos que el cambio del perfil lipídico de la membrana sigue produciendo, al igual que en las células acinares de rata (Martínez et al., 2004; Yago et al., 2004) diferencias en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en función del ácido graso en el que se enriquece la membrana.

La modificación de la membrana con ácidos grasos disminuye la secreción basal de amilasa, se ha observado anteriormente con las membranas ricas en ácido oleico y en PUFAs n-3. Nosotros encontramos una relación directa entre el contenido de PUFA y la secreción basal de amilasa, de este modo a mayor proporción de PUFA mayor secreción basal de amilasa. Estos resultados concuerdan a los encontrados por nuestro grupo (Yago *et al.*, 2004) en acinos de ratas alimentadas con dietas ricas en aceite de oliva o aceite de girasol, a mayor proporción de PUFA en las membranas acinares, mayor secreción basal de amilasa. El hecho de que el grupo con mayor cantidad de PUFAs (Mn-3) haya mostrado niveles más altos de secreción basal de esta enzima (en relación al grupo MO), nos sugiere que la mayor proporción de estos ácidos grasos presente en las membranas de las células puede afectar el sistema secretor acinar. De hecho, Begin y colaboradores (1990) sugieren que ácidos grasos específicos pueden influir en la proporción de enzimas digestivas específicas en los gránulos de zimógeno. En relación a la secreción estimulada, nuestros resultados han puesto de manifiesto que la capacidad de secreción de la célula acinar en respuesta a un secretagogo como CCK-8 se modifica de acuerdo al ácido graso específico presente de forma mayoritaria en la membrana y más probablemente de acuerdo a la proporción de PUFA que origine el enriquecimiento de las membranas. A diferencia de lo que ocurría en la secreción basal de amilasa, la relación encontrada entre PUFA y secreción neta estimulada por CCK-8 fue inversamente proporcional, a mayor proporción de PUFA menor secreción en respuesta a CCK-8. Esto también concuerda con los resultados encontrados por nuestro grupo en células acinares de ratas (Yago *et al.*, 2004), en donde la relación PUFA y secreción neta estimulada por CCK-8 fue inversamente proporcional. La afectación de los mecanismos secretores causado por el enriquecimiento de las membranas en PUFAs n-3 podría tener un impacto negativo si consideramos que esto podría causar una mayor acumulación de gránulos de zimógeno en el interior de la célula acinar.



El efecto que ejerce la ceruleína en estos grupos, no siempre es el mismo:

- En relación con la **respuesta inflamatoria** inducida por la ceruleína, hemos observado un efecto protector por parte de estas membranas respecto a las no modificadas como vimos anteriormente. Aunque ambas demuestran una respuesta inflamatoria menor, esta podría atribuirse a mecanismos diferentes. En el caso de las membranas MO posiblemente se deba a la resistencia que presentan las membranas ricas en MUFAs frente a un ataque oxidativo (Quiles et al., 2006; Bello et al., 2006), como podría ser el caso de la hiperestimulación con ceruleína, de manera que dicha estimulación en este grupo no cursaría con la degradación de las proteínas citosólicas I $\kappa$ B $\alpha$  y activación del NF- $\kappa$ B, sensible a la generación de ERO (Yu et al., 2002; Yu et al., 2005b), lo que parece coincidir con nuestros resultados. Sin embargo, en el caso de las membranas Mn-3 esta protección podría atribuirse a la acción antiinflamatoria que ejercen los PUFAs n-3 de cadena larga, bien a través de su acción sobre factores de transcripción influyendo en la expresión de genes; o mediada por la producción de eicosanoides antiinflamatorios (ver pág. 223-224). De hecho, aunque los niveles nucleares de p65 son similares en ambos grupos, las concentraciones citosólicas de I $\kappa$ B $\alpha$  son significativamente mayores en el grupo CeMn-3 (P=0,000), lo que podría confirmar la teoría de que es a través de vías diferentes, ya que se ha demostrado que el DHA tiene la capacidad de incrementar la expresión de estos inhibidores citosólicos del NF- $\kappa$ B, además de regular negativamente la unión de dicho factor de transcripción con el DNA (Xu et al., 2001; Weldon et al., 2006). Por lo que el hecho de que ambos presenten niveles nucleares de p65 similares, indica que en ambos grupos se está inhibiendo la unión al DNA o la traslocación del NF- $\kappa$ B al núcleo, pero el hecho de que el grupo CeMn-3 muestre mayores concentraciones citoplasmáticas de I $\kappa$ B $\alpha$  sugiere que están interviniendo los PUFAs n-3. Esta inactivación del NF- $\kappa$ B en ambos grupos, se traduce en una disminución de la producción de citocinas proinflamatorias, mostrando el grupo CeMn-3 una concentración ligeramente menor de IL-6 que el grupo CeMO (P=0,1) (figura 25), consecuencia, probablemente, de la acción de los PUFAs n-3, a través de la potenciación de los PPAR y la inhibición del NF- $\kappa$ B (Jiang et al., 1998; Xu et al., 2001). En cuanto al índice IL-10/IL-6, no existen diferencias significativas entre ambos grupos, demostrando el efecto beneficioso que podrían tener ambos perfiles lipídicos en el desarrollo de una respuesta inflamatoria celular en este modelo de la pancreatitis aguda.

- Respecto a los **mecanismos de muerte celular** inducidos por la ceruleína, aunque ambos grupos presentan una mayor resistencia frente a la concentración de ceruleína  $10^{-8}$  M, el grupo Mn-3, a diferencia del grupo MO presenta una disminución en el porcentaje de células vivas con la concentración de ceruleína  $10^{-7}$  M. De hecho a la concentración  $10^{-8}$  M, aunque a las 24 h no produce alteraciones en la membrana (ensayo apoptosis/necrosis) en el grupo Ce-8Mn-3, sí se aprecia una disminución en la **viabilidad celular** en función de la actividad metabólica (ensayo MTT), mientras que en el grupo Ce-8MO permanece intacta dicha viabilidad. Estos resultados demuestran una mayor resistencia de las membranas enriquecidas en MUFAs ante la presencia de un estímulo nocivo como la ceruleína. Posiblemente no dependa del índice de insaturación que presentan ambas membranas (UI) sino del número de dobles enlaces de cada ácido graso, relación MUFA/PUFA, resultando los PUFA más susceptibles a sufrir un daño oxidativo debido a la mayor cantidad de átomos de hidrógeno bis-aliáticos que presentan (Horton et al., 1987). Esta mayor resistencia de las células con membranas enriquecidas en MUFA también se ha observado en otros estudios, donde se relaciona el enriquecimiento de la membrana mitocondrial en estos ácidos grasos, con un mejor potencial de membrana y una menor activación de caspasas y factores apoptóticos (Gutiérrez-Ríos 2009).
- En cuanto a la funcionalidad celular tras el tratamiento con ceruleína  $10^{-8}$  M, la movilización de  $Ca^{2+}$  citosólico en respuesta a CCK-8 se afecta en ambos grupos de membrana. Si bien, la afectación de ambos grupos de membranas modificadas es menor que la que presenta el grupo CeNM. Respecto a la secreción de amilasa, el tratamiento con ceruleína no afecta tanto a las células con membranas enriquecidas en ácidos grasos n-3, probablemente porque la respuesta ya se encontraba afectada tras la modificación (ver pág. 240-241).

A la vista de nuestros resultados se demuestra que la modificación del perfil lipídico de membrana modula el daño producido por la ceruleína.

El efecto de la presencia del HT en estos grupos es totalmente diferente dependiendo de la presencia o ausencia de la ceruleína y del tipo de membrana. El tratamiento previo con HT y la presencia durante la incubación con ceruleína  $10^{-8}$  M, produjo en el grupo CeMOHT un aumento en los niveles nucleares de p65, aunque no se tradujo en un aumento en la producción de IL-6, mientras que en el grupo Mn-3 ni en ausencia ni en presencia de

ceruleina se observó una activación del NF- $\kappa$ B. Por otra parte, el ensayo MTT puso de manifiesto la citotoxicidad que ejerce el HT para las células modificadas en oleico (figura 38), mientras que en el grupo Mn-3HT no se observa este daño. Sin embargo, en la funcionalidad celular, tanto en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico como en la secreción de amilasa en respuesta a CCK-8, el efecto en ambos grupos es similar. En relación a estos efectos de HT, pareciera que tiene un efecto independiente del tipo de membrana, a nivel de funcionalidad, reduce la secreción basal de amilasa esté la célula dañada o no dañada. Mientras que a nivel de secreción neta estimulada por CCK-8, el HT siempre aumenta la respuesta, aunque este efecto es mucho más pronunciado si la célula no está dañada.

Con todo, se pone de manifiesto un efecto mayoritariamente prooxidante en el grupo MO y antioxidante en el grupo Mn-3, posiblemente por el menor estrés oxidativo que presentan las células con membranas modificadas en oleico, lo que manifiesta cierta cautela en el consumo innecesario de grandes cantidades de compuestos antioxidantes.

# **C**ONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. Describimos por primera vez un modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en la línea celular AR42J, diferenciando las células hacia un fenotipo exocrino con dexametasona. La diferenciación de las células AR42J con dexametasona consigue un fenotipo celular más cercano al que presentan las células acinares de rata. Este aspecto metodológico hace que algunos resultados obtenidos por nosotros en este modelo no concuerden con los descritos por otros autores en células ar42j no diferenciadas con un fenotipo anficrino.

2. Se describe un método para la modificación del perfil lipídico de las membranas de las células AR42J por enriquecimiento de ellas en determinados ácidos grasos, inducido por la presencia de éstos en el medio de cultivo. Estas modificaciones se asemejan a las inducidas en células acinares de rata por la ingesta habitual de distintos tipos de grasa en la dieta. Este modelo permite estudiar las repercusiones funcionales de esta modificación.

3. En el modelo descrito, el daño celular con ceruleína ( $10^{-8}$  M y  $10^{-7}$  M)

- a) Desencadena una respuesta inflamatoria que se evidencia por la activación del factor de transcripción NFkB juzgado por la determinación de los niveles citosólicos del Ikb $\alpha$  y nucleares de p65. Esta respuesta inflamatoria se confirma por los niveles incrementados de IL-6 y disminuidos de IL-10, con un menor cociente IL-6/IL-10, un biomarcador que se relaciona de forma inversa con la gravedad de la respuesta inflamatoria pancreática.
- b) Incrementa proporcionalmente la muerte celular por apoptosis y disminuye la necrosis. La viabilidad celular (ensayo MTT) se encuentra disminuida.
- c) En los parámetros de funcionalidad celular: 1) la respuesta de la  $[Ca^{2+}]_c$  a la CCK-8 está muy disminuida, especialmente en la liberación inicial de este catión tras la estimulación; 2) La secreción neta de amilasa también se encuentra disminuida significativamente frente a las no tratadas con ceruleína.

En conjunto, nuestro modelo muestra un daño celular claro que se asemeja a lo descrito en otros modelos de pancreatitis aguda *in vivo* e *in vitro* con células AR42J no diferenciadas en parámetros inflamatorios, muerte celular, cambios en  $Ca^{2+}$  citosólico y secreción neta de amilasa.

4. Respecto al papel del Hidroxitirosol (HT), un compuesto fenólico presente en cantidades importantes en la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen, tanto en células sin o con modificación del perfil lipídico de la membrana y con o sin la presencia de daño por ceruleína, sería prolijo describir todos los resultados obtenidos en este memoria por lo que en esta conclusión recogeremos, de forma resumida, la líneas generales de su actuación. En nuestro modelo experimental y en las distintas situaciones antes expuestas, el HT presenta efectos pleiotropicos, comportándose como antioxidante, prooxidante y no afectando a las células en los diferentes supuestos experimentales. De forma general, su actuación como antioxidante se pone de manifiesto cuando se incrementa la poliinsaturación de las membranas celulares y cuando se produce un daño importante en la célula que cursa con estrés oxidativo. En otras situaciones, membranas menos poliinsaturadas o células no dañadas, se comportan como antioxidante o no tienen efecto. Un hecho a destacar que se repite en todos los grupos experimentales es su efecto potenciando la secreción de amilasa estimulada por CCK-8.

5. La modificación del perfil lipídico (de ácidos grasos) de membrana por la presencia de ácido oleico y de EPA/DHA en el medio de cultivo provoca en las células AR42J cambios en la respuesta inflamatoria, viabilidad y muerte celular, y funcionalidad celular (movimientos de  $Ca^{2+}$  citosólico, y secreción de amilasa). Estos cambios se manifiestan tanto en ausencia como en presencia de ceruleína:

1. En células intactas, sin ceruleína, los principales cambios afectan a la importancia relativa de los mecanismos de muerte celular, y la secreción de amilasa.
2. En células dañadas con ceruleína, desaparece la respuesta inflamatoria, los mecanismos de muerte celular se ven menos afectados o cambia la importancia relativa de cada uno de ellos, y la funcionalidad celular sigue afectada.

6. Comparativamente, el enriquecimiento de las membranas en MUFAS o PUFAS n-3 de cadena larga, provoca comportamientos celulares diferentes que se traducen en:

- a) En ambos grupos la inflamación inducida por ceruleína disminuye aunque, probablemente, por distintos mecanismos
- b) El enriquecimiento en PUFAS n-3 induce un incremento en la muerte celular por apoptosis mientras que el grupo cuyas membranas son ricas en MUFAs es menos sensible en muerte celular al daño por ceruleína

- c) La secreción de amilasa estimulada por CCK-8 se ve muy afectada en las células cuya membrana es rica en PUFAS n-3, especialmente tras el daño provocado por ceruleína.

## CONCLUSIÓN GENERAL

En el estudio recogido en esta memoria perseguíamos dos objetivos, uno era desarrollar un modelo experimental *in vitro* que nos permitiera conocer la influencia que el cambio en el perfil de ácidos grasos de la membrana que se produce *in vivo* mediante cambios en la ingesta habitual del tipo de grasa en la dieta y como este cambio de membrana afectaría a la respuesta de la célula tras provocar un daño oxidativo-inflamatorio con ceruleína (pancreatitis aguda). El otro objetivo era estudiar distintos ingredientes de la dieta mediterránea y su papel previniendo o atenuando el daño celular. Hemos elegido el ácido oleico y los ácidos grasos omega-3 de cadena larga, del aceite de oliva virgen y el pescado, respectivamente para modificar las membranas y el hidroxitirosol como representante de la riqueza en antioxidantes de la dieta mediterránea para ver su papel y la interacción con las modificaciones de membrana.

Los datos recogidos en esta memoria nos permiten afirmar que hemos desarrollado un modelo *in vitro* válido de pancreatitis por ceruleína en células AR42J diferenciadas con un fenotipo más cercano a las células acinares pancreáticas que los realizados con células no diferenciadas y que permite la modificación del perfil lipídico de la membrana.

Respecto a los resultados obtenidos utilizando los ingredientes de la dieta mediterránea, creemos que, en conjunto, la modificación del perfil de ácidos grasos de membrana presenta aspectos positivos frente al daño provocado por ceruleína tanto en la respuesta inflamatoria como en los parámetros de estrés oxidativo y los mecanismos de muerte celular. No obstante creemos que son necesarios posteriores estudios que aclaren algunos aspectos del papel de estos ingredientes en el daño celular. Entre ellos podemos mencionar:

- La utilización para la modificación de las membranas de una mezcla de ácidos grasos que reproduzca el perfil de la dieta mediterránea
- La aclaración de que en que situaciones y a que dosis los antioxidantes de la dieta ejercen su papel



- Conocer la importancia de las modificaciones observadas en el daño celular tras las modificaciones de membrana.

De forma general, esta memoria constituye un avance en el desarrollo de un modelo experimental válido y un punto de partida para profundizar en la importancia que el perfil lipídico de las membranas celulares, determinado por la calidad de la grasa de nuestra dieta, tiene en la respuesta de las células a estímulos nocivos. Esto nos ayudaría a conocer los mecanismos a través de los cuales una dieta saludable, como la mediterránea, disminuye la susceptibilidad frente a distintas enfermedades.

# **B**IBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Abedin L, Lien EL, Vingrys AJ, Sinclair AJ (1999) The effects of dietary alpha-linolenic acid compared with docosahexaenoic acid on brain, retina, liver, and heart in the guinea pig. *Lipids* **34**(5): 475-482
- Adams JM, Cory S (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* **26**(1): 61-66
- Adrain C, Martin SJ (2001) The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* **26**(6): 390-397
- Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal BB (2006) Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation. *Mol Pharmacol* **69**(1): 195-206
- Aguilera CM, Ramirez-Tortosa CL, Quiles JL, Yago MD, Martinez-Burgos MA, Martinez-Victoria E, Gil A, Ramirez-Tortosa MC (2005) Monounsaturated and omega-3 but not omega-6 polyunsaturated fatty acids improve hepatic fibrosis in hypercholesterolemic rabbits. *Nutrition* **21**(3): 363-371
- Akao S, Bockman DE, Lechene de la Porte P, Sarles H (1986) Three-dimensional pattern of ductuloacinar associations in normal and pathological human pancreas. *Gastroenterology* **90**(3): 661-668
- Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC, Ma J (2002) Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N Engl J Med* **346**(15): 1113-1118
- Alhan E, Turkyilmaz S, Ercin C, Kaklikkaya N, Kural BV (2006) Effects of omega-3 fatty acids on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Eur Surg Res* **38**(3): 314-321
- Alonso F, Henson PM, Leslie CC (1986) A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* **878**(2): 273-280
- Anastasi A, Erspamer V, Endean R (1968) Isolation and amino acid sequence of caerulein, the active decapeptide of the skin of hyla caerulea. *Arch Biochem Biophys* **125**(1): 57-68
- Audi N (2008) 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. Universidad de Granada, Granada
- Audi N, Mesa MD, Martínez MA, Martínez-Victoria E, Manas M, Yago MD (2007) Membrane lipid composition of pancreatic AR42J cells: modification by exposure to different fatty acids. *Exp Biol Med (Maywood)* **232**(4): 532-541

Babu BI, Malleo G, Genovese T, Mazzon E, Di Paola R, Crisafulli C, Caminiti R, Siriwardena AK, Cuzzocrea S (2009) Green tea polyphenols ameliorate pancreatic injury in cerulein-induced murine acute pancreatitis. *Pancreas* **38**(8): 954-967

Bao TR, Lu ZS, Wu XF, Song YF (1988) [Study on the innervation of guinea pig pineal gland--with the methods of fluorescence and acetylcholinesterase]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* **19**(4): 354-358

Barlow TE, Greenwell JR, Harper AA, Scratcherd T (1971) The effect of adrenaline and noradrenaline on the blood flow, electrical conductance and external secretion of the pancreas. *J Physiol* **217**(3): 665-678

Barros LF, Hermosilla T, Castro J (2001a) Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **130**(3): 401-409

Barros LF, Stutzin A, Calixto A, Catalan M, Castro J, Hetz C, Hermosilla T (2001b) Nonselective cation channels as effectors of free radical-induced rat liver cell necrosis. *Hepatology* **33**(1): 114-122

Battino M, Quiles JL, Huertas JR, Ramirez-Tortosa MC, Cassinello M, Manas M, Lopez-Frias M, Mataix J (2002) Feeding fried oil changes antioxidant and fatty acid pattern of rat and affects rat liver mitochondrial respiratory chain components. *J Bioenerg Biomembr* **34**(2): 127-134

Bechoua S, Dubois M, Dominguez Z, Goncalves A, Nemoz G, Lagarde M, Prigent AF (1999) Protective effect of docosahexaenoic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* **57**(9): 1021-1030

Begin ME, Ells G, St-Jean P, Vachereau A, Beaudoin AR (1990) 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**(3): 151-160

Bello RI, Gomez-Diaz C, Buron MI, Navas P, Villalba JM (2006) Differential regulation of hepatic apoptotic pathways by dietary olive and sunflower oils in the aging rat. *Exp Gerontol* **41**(11): 1174-1184

Belluzzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M (1996) Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* **334**(24): 1557-1560

Berlin E, Bhathena SJ, McClure D, Peters RC (1998) Dietary menhaden and corn oils and the red blood cell membrane lipid composition and fluidity in hyper- and normocholesterolemic miniature swine. *J Nutr* **128**(9): 1421-1428

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

Berridge MJ (2006) Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* **40**(5-6): 405-412

Berridge MJ, Galione A (1988) Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J* **2**(15): 3074-3082

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 11-21
- Bhatia M (2004) Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**(2): G189-196
- Bhatia M, Brady M, Kang YK, Costello E, Newton DJ, Christmas SE, Neoptolemos JP, Slavin J (2002) MCP-1 but not CINC synthesis is increased in rat pancreatic acini in response to cerulein hyperstimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**(1): G77-85
- Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J (2000) Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* **190**(2): 117-125
- Bhatia M, Mochhala S (2004) Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* **202**(2): 145-156
- Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L (2005) Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology* **5**(2-3): 132-144
- Biondo PD, Brindley DN, Sawyer MB, Field CJ (2008) The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. *J Nutr Biochem* **19**(12): 787-796
- Bishop WR, Bell RM (1988) Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu Rev Cell Biol* **4**: 579-610
- Bloom W, Fawcett DW (1981) *Páncreas*, España: Labor S.A.
- Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **11**(2): 529-541
- Bockman DE, Boydston WR, Parsa I (1983) Architecture of human pancreas: implications for early changes in pancreatic disease. *Gastroenterology* **85**(1): 55-61
- Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F (2007) Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* **190**(1): 181-186
- Bonifacino JS, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**(2): 153-166
- Bonizzi G, Karin M (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**(6): 280-288
- Booth DM, Murphy JA, Mukherjee R, Awais M, Neoptolemos JP, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R, Criddle DN (2010) Reactive Oxygen Species Induced by Bile Acid Induce Apoptosis and Protect Against Necrosis in Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology*

- Bootman MD, Lipp P (2001) *Calcium Signalling and Regulation of Cell Function*: Nature Publishing Group.
- Borgström B (1993) *Luminal digestion of fats*. Go, V.L.W. Dimagno, E. P. Gardner, J. D. Leberthal, E. Reber, H. A. Scheele, G. A. eds. *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease*, 2 edn. New York: Raven Press.
- Bors W, Michel C, Stettmaier K (2000) Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. *Arch Biochem Biophys* **374**(2): 347-355
- Bose C, Zhang H, Udupa KB, Chowdhury P (2005) 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**(5): G926-934
- Bouaziz A, Salido S, Linares-Palomino PJ, Sanchez A, Altarejos J, Bartegi A, Salido GM, Rosado JA (2007) Cinnamtannin B-1 from bay wood reduces abnormal intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and platelet hyperaggregability in type 2 diabetes mellitus patients. *Arch Biochem Biophys* **457**(2): 235-242
- Bovicelli P (2007) Radical-scavenging polyphenols: new strategies for their synthesis. *J Pharm Pharmacol* **59**(12): 1703-1710
- Bozem M, Kuhlmann S, Blum R, Feick P, Schulz I (2000) Hormone-stimulated calcium release is inhibited by cytoskeleton-disrupting toxins in AR4-2J cells. *Cell Calcium* **28**(2): 73-82
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Bragado MJ, San Roman JI, Gonzalez A, Garcia LJ, Lopez MA, Calvo JJ (1996) Impairment of intracellular calcium homeostasis in the exocrine pancreas after caerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Clin Sci (Lond)* **91**(6): 771
- Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* **56**(11): 317-333
- Briante R, Febbraio F, Nucci R (2004) Antioxidant/prooxidant effects of dietary non-flavonoid phenols on the Cu<sup>2+</sup>-induced oxidation of human low-density lipoprotein (LDL). *Chem Biodivers* **1**(11): 1716-1729
- Broughton KS, Johnson CS, Pace BK, Liebman M, Kleppinger KM (1997) Reduced asthma symptoms with n-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production. *Am J Clin Nutr* **65**(4): 1011-1017
- Bruce JI, Elliott AC (2007) Oxidant-impaired intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in pancreatic acinar cells: role of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**(3): C938-950
- Buchler MW, Gloor B, Muller CA, Friess H, Seiler CA, Uhl W (2000) Acute necrotizing pancreatitis: treatment strategy according to the status of infection. *Ann Surg* **232**(5): 619-626

- Burgoyne RD (2007) Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca<sup>2+</sup> signalling. *Nat Rev Neurosci* **8**(3): 182-193
- Calder PC (2006) n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* **83**(6 Suppl): 1505S-1519S
- Calder PC (2008) Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res* **52**(8): 885-897
- Calzada C, Vericel E, Lagarde M (1992) Lower levels of lipid peroxidation in human platelets incubated with eicosapentaenoic acid. *Biochim Biophys Acta* **1127**(2): 147-152
- Camandola S, Leonarduzzi G, Musso T, Varesio L, Carini R, Scavazza A, Chiarotto E, Baeuerle PA, Poli G (1996) Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* **229**(2): 643-647
- Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ (2008) Age-related alterations in Ca<sup>2+</sup> signals and mitochondrial membrane potential in exocrine cells are prevented by melatonin. *J Pineal Res* **45**(2): 191-198
- Camello C, Camello PJ, Pariente JA, Salido GM (2000) Effects of antioxidants on calcium signal induced by cholecystokinin in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol Biochem* **56**(3): 173-180
- Campoio TR, Oliveira FA, Otton R (2011) Oxidative stress in human lymphocytes treated with fatty acid mixture: Role of carotenoid astaxanthin. *Toxicol In Vitro*
- Cancela JM (2001) Specific Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by cholecystokinin and acetylcholine: the roles of NAADP, cADPR, and IP<sub>3</sub>. *Annu Rev Physiol* **63**: 99-117
- Carafoli E (1994) Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J* **8**(13): 993-1002
- Carafoli E (2010) The fateful encounter of mitochondria with calcium: how did it happen? *Biochim Biophys Acta* **1797**(6-7): 595-606
- Carluccio MA, Massaro M, Bonfrate C, Siculella L, Maffia M, Nicolardi G, Distante A, Storelli C, De Caterina R (1999) Oleic acid inhibits endothelial activation : A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(2): 220-228
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A, De Caterina R (2003) Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(4): 622-629
- Carvalho KM, Morais TC, de Melo TS, de Castro Brito GA, de Andrade GM, Rao VS, Santos FA (2010) The natural flavonoid quercetin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Biol Pharm Bull* **33**(9): 1534-1539



Case RM, Argent BE (1993) *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease*, New York: Raven Press.

Clandinin MT, Cheema S, Field CJ, Garg ML, Venkatraman J, Clandinin TR (1991) Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J* **5**(13): 2761-2769

Clandinin MT, Field CJ, Hargreaves K, Morson L, Zsigmond E (1985) Role of diet fat in subcellular structure and function. *Can J Physiol Pharmacol* **63**(5): 546-556

Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**(6): 1047-1058

Clapham DE, Neer EJ (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 167-203

Cohen MC, Cohen S (1996) Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol* **105**(5): 589-598

Cornwell DG, Ma J (2008) Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *J Agric Food Chem* **56**(19): 8774-8786

Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessi MA, Spencer JP (2007) Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem Biophys Res Commun* **362**(3): 606-611

Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Jovenitti IE, Cremona A, Berra B, Rizzo AM (2011) Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids Health Dis* **10**(1): 73

Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**(9): 647-656

Cosen-Binker LI, Gaisano HY (2007) Recent insights into the cellular mechanisms of acute pancreatitis. *Can J Gastroenterol* **21**(1): 19-24

Couloubaly S, Delomenie C, Rousseau D, Paul JL, Grynberg A, Pourci ML (2007) Fatty acid incorporation in endothelial cells and effects on endothelial nitric oxide synthase. *Eur J Clin Invest* **37**(9): 692-699

Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, Petersen OH, Gerasimenko OV (2007a) Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ* **14**(7): 1285-1294

Criddle DN, McLaughlin E, Murphy JA, Petersen OH, Sutton R (2007b) The pancreas misled: signals to pancreatitis. *Pancreatology* **7**(5-6): 436-446

Criddle DN, Murphy J, Fistetto G, Barrow S, Tepikin AV, Neoptolemos JP, Sutton R, Petersen OH (2006) Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. *Gastroenterology* **130**(3): 781-793

- Criddle DN, Raraty MG, Neoptolemos JP, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R (2004) Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29): 10738-10743
- Czako L, Yamamoto M, Otsuki M (1997) Exocrine pancreatic function in rats after acute pancreatitis. *Pancreas* **15**(1): 83-90
- Chan YC, Leung PS (2011) Co-operative effects of angiotensin II and caerulein in NFkappaB activation in pancreatic acinar cells in vitro. *Regul Pept* **166**(1-3): 128-134
- Chanson M, Fanjul M, Bosco D, Nelles E, Suter S, Willecke K, Meda P (1998) Enhanced secretion of amylase from exocrine pancreas of connexin32-deficient mice. *J Cell Biol* **141**(5): 1267-1275
- Chapkin RS, Hong MY, Fan YY, Davidson LA, Sanders LM, Henderson CE, Barhoumi R, Burghardt RC, Turner ND, Lupton JR (2002) Dietary n-3 PUFA alter colonocyte mitochondrial membrane composition and function. *Lipids* **37**(2): 193-199
- Chaudhry A, Rubin RP (1990) Mediators of Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent secretion. *Environ Health Perspect* **84**: 35-39
- Chen M, Wang J (2002) Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* **7**(4): 313-319
- Chen P, Huang L, Zhang Y, Qiao M, Yuan Y (2010) SiRNA-mediated PIAS1 silencing promotes inflammatory response and leads to injury of cerulein-stimulated pancreatic acinar cells via regulation of the P38MAPK signaling pathway. *Int J Mol Med* **26**(4): 619-626
- Chen R, Valencia I, Zhong F, McColl KS, Roderick HL, Bootman MD, Berridge MJ, Conway SJ, Holmes AB, Mignery GA, Velez P, Distelhorst CW (2004) Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol* **166**(2): 193-203
- Chen X, Edwards JA, Logsdon CD, Ernst SA, Williams JA (2002) Dominant negative Rab3D inhibits amylase release from mouse pancreatic acini. *J Biol Chem* **277**(20): 18002-18009
- Chey WY, Chang T (2001) Neural hormonal regulation of exocrine pancreatic secretion. *Pancreatol* **1**(4): 320-335
- Chinetti G, Fruchart JC, Staels B (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* **49**(10): 497-505
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* **37**(3): 299-310
- Cho W, Stahelin RV (2005) Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**: 119-151

Chow SC, Sisfontes L, Jondal M, Bjorkhem I (1991) Modification of membrane phospholipid fatty acyl composition in a leukemic T cell line: effects on receptor mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> increase. *Biochim Biophys Acta* **1092**(3): 358-366

Christophe J (1994) Pancreatic tumoral cell line AR42J: an amphicrine model. *Am J Physiol* **266**(6 Pt 1): G963-971

Dai S, Hirayama T, Abbas S, Abu-Amer Y (2004) The IkappaB kinase (IKK) inhibitor, NEMO-binding domain peptide, blocks osteoclastogenesis and bone erosion in inflammatory arthritis. *J Biol Chem* **279**(36): 37219-37222

Damm I, Mikkat U, Kirchhoff F, Bockmann S, Jonas L (2004) 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**(1): 31-37

De Caterina R, Zampolli A (2007) Omega-3 fatty acids, atherogenesis, and endothelial activation. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **8 Suppl 1**: S11-14

de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR (1999) Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol* **57**(4): 445-449

de la Torre R (2008) Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. *Inflammopharmacology* **16**(5): 245-247

De Lisle RC, Norkina O, Roach E, Ziemer D (2005) Expression of pro-Muclin in pancreatic AR42J cells induces functional regulated secretory granules. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**(5): C1169-1178

De Pablo MA, Gaforio JJ, Puertollano MA, Ortega E, Álvarez De Cienfuegos G (2000). Modulación de las funciones inmunes por ácidos grasos. Papel del aceite de oliva en la inmunidad. Jaén. Universidad Internacional de Baeza.

Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR (2002) The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**(4): 525-535

Del Castillo-Vaquero A, Salido GM, Gonzalez A (2010) Increased calcium influx in the presence of ethanol in mouse pancreatic acinar cells. *Int J Exp Pathol* **91**(2): 114-124

Delerive P, Fruchart JC, Staels B (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* **169**(3): 453-459

Della Ragione F, Cucciolla V, Criniti V, Indaco S, Borriello A, Zappia V (2002) Antioxidants induce different phenotypes by a distinct modulation of signal transduction. *FEBS Lett* **532**(3): 289-294

Denham W, Yang J, Fink G, Denham D, Carter G, Bowers V, Norman J (1998) TNF but not IL-1 decreases pancreatic acinar cell survival without affecting exocrine function: a study in the perfused human pancreas. *J Surg Res* **74**(1): 3-7

- Diaz RJ, Yago MD, Martinez-Victoria E, Naranjo JA, Martinez MA, Manas M (2003) Comparison of the effects of dietary sunflower oil and virgin olive oil on rat exocrine pancreatic secretion in vivo. *Lipids* **38**(11): 1119-1126
- Dietrich JB (1996) AR4-2J cells: a model to study polypeptide hormone receptors. *Biosci Rep* **16**(4): 273-288
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**(5): 1475-1489
- DiMugno EP, Go VL, Summerskill WH (1973) Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency. *N Engl J Med* **288**(16): 813-815
- Dinarello CA (1994) The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* **5**(6): 517-531
- Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**(6): 2095-2147
- Ding S, Mersmann HJ (2001) Fatty acids modulate porcine adipocyte differentiation and transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic proteins\*. *J Nutr Biochem* **12**(2): 101-108
- Dockray GJ (1987) *Physiology of enteric neuropeptides. In Physiology of the Gastrointestinal Tract*, New York: Raven Press.
- Drenckhahn D, Mannherz HG (1983) Distribution of actin and the actin-associated proteins myosin, tropomyosin, alpha-actinin, vinculin, and villin in rat and bovine exocrine glands. *Eur J Cell Biol* **30**(2): 167-176
- Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ (2004) Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* **135**(1): 64-73
- Dupertuis YM, Meguid MM, Pichard C (2007) Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulations using polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10**(4): 427-432
- Edinger AL, Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **16**(6): 663-669
- Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uhl M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R, Berger W, Micksche M (2005) Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J* **19**(7): 807-809
- Elinson N, Amichay D, Birk RZ (2006) Leptin directly regulates exocrine pancreas lipase and two related proteins in the rat. *Br J Nutr* **96**(4): 691-696
- Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(3): 181-191

- Eum WS, Li MZ, Sin GS, Choi SY, Park JB, Lee JY, Kwon HY (2003) Dexamethasone-induced differentiation of pancreatic AR42J cell involves p21(waf1/cip1) and MAP kinase pathway. *Exp Mol Med* **35**(5): 379-384
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**(7): 2207-2216
- Farkas G, Marton J, Mandi Y, Leindler L (2006) Surgical management and complex treatment of infected pancreatic necrosis: 18-year experience at a single center. *J Gastrointest Surg* **10**(2): 278-285
- Farquhar MG, Palade GE (1981) The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage. *J Cell Biol* **91**(3 Pt 2): 77s-103s
- Feick P, Gilhaus S, Blum R, Hofmann F, Just I, Schulz I (1999) Inhibition of amylase secretion from differentiated AR4-2J pancreatic acinar cells by an actin cytoskeleton controlled protein tyrosine phosphatase activity. *FEBS Lett* **451**(3): 269-274
- Fernandez-del Castillo C, Harringer W, Warshaw AL, Vlahakes GJ, Koski G, Zaslavsky AM, Rattner DW (1991) Risk factors for pancreatic cellular injury after cardiopulmonary bypass. *N Engl J Med* **325**(6): 382-387
- Ferreira L, Perez-Gonzalez N, Llanillo M, Calvo JJ, Sanchez-Bernal C (2002) Acute pancreatitis decreases pancreas phospholipid levels and increases susceptibility to lipid peroxidation in rat pancreas. *Lipids* **37**(2): 167-171
- Ferris CD, Haganir RL, Bredt DS, Cameron AM, Snyder SH (1991) Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6): 2232-2235
- Fini L, Hotchkiss E, Fogliano V, Graziani G, Romano M, De Vol EB, Qin H, Selgrad M, Boland CR, Ricciardiello L (2008) Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis* **29**(1): 139-146
- Fink GW, Norman JG (1997) Specific changes in the pancreatic expression of the interleukin 1 family of genes during experimental acute pancreatitis. *Cytokine* **9**(12): 1023-1027
- Forsmark CE (2008) Acute pancreatitis is on the rise. *Curr Gastroenterol Rep* **10**(2): 99-100
- Forster ER, Green T, Elliot M, Bremner A, Dockray GJ (1990) Gastric emptying in rats: role of afferent neurons and cholecystokinin. *Am J Physiol* **258**(4 Pt 1): G552-556
- Foulis AK (1980) Histological evidence of initiating factors in acute necrotising pancreatitis in man. *J Clin Pathol* **33**(12): 1125-1131
- Frossard JL, Rubbia-Brandt L, Wallig MA, Benathan M, Ott T, Morel P, Hadengue A, Suter S, Willecke K, Chanson M (2003) Severe acute pancreatitis and reduced acinar cell

- apoptosis in the exocrine pancreas of mice deficient for the Cx32 gene. *Gastroenterology* **124**(2): 481-493
- Gaiser S, Ahler A, Gundling F, Kruse ML, Savkovic V, Selig L, Teich N, Tomasini R, Dagorn JC, Mossner J, Keim V, Bodeker H (2005) Expression of mutated cationic trypsinogen reduces cellular viability in AR4-2J cells. *Biochem Biophys Res Commun* **334**(2): 721-728
- Galione A, Petersen OH (2005) The NAADP receptor: new receptors or new regulation? *Mol Interv* **5**(2): 73-79
- Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, O'Shea JJ, Chrousos GP, Bornstein SR (2002) Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J* **16**(1): 61-71
- Gardner JD, Jensen RT (1993) in *The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*, 2 edn. New York: Raven Press.
- Garg A, Bonanome A, Grundy SM, Zhang ZJ, Unger RH (1988) Comparison of a high-carbohydrate diet with a high-monounsaturated-fat diet in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **319**(13): 829-834
- Gebhardt A, Ackermann W, Unver N, Elsasser HP (2004) Expression of galectin-3 in the rat pancreas during regeneration following hormone-induced pancreatitis. *Cell Tissue Res* **315**(3): 321-329
- Geokas MC, Rinderknecht H (1974) Free proteolytic enzymes in pancreatic juice of patients with acute pancreatitis. *Am J Dig Dis* **19**(7): 591-598
- Gerasimenko JV, Sherwood M, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV (2006) NAADP, cADPR and IP<sub>3</sub> all release Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J Cell Sci* **119**(Pt 2): 226-238
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005) Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(6): 449-461
- Geusens P, Wouters C, Nijs J, Jiang Y, Dequeker J (1994) Long-term effect of omega-3 fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A 12-month, double-blind, controlled study. *Arthritis Rheum* **37**(6): 824-829
- Ghosh S, Karin M (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109** Suppl: S81-96
- Gill CI, Boyd A, McDermott E, McCann M, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro G, McGlynn H, Rowland I (2005) Potential anti-cancer effects of virgin olive oil phenols on colorectal carcinogenesis models in vitro. *Int J Cancer* **117**(1): 1-7
- Giorgi C, Romagnoli A, Pinton P, Rizzuto R (2008) Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondria and cell death. *Curr Mol Med* **8**(2): 119-130
- Go VLW (1993) *The Pancreas: Biology, pathobiology, and disease*, Vol. 2nd edition New York: Raven Press.

- Goldbeter A, Dupont G, Berridge MJ (1990) Minimal model for signal-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(4): 1461-1465
- Gonzalez-Gallego J, Garcia-Mediavilla MV, Sanchez-Campos S, Tunon MJ (2010) Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr* **104 Suppl 3**: S15-27
- Gonzalez A, Schmid A, Sternfeld L, Krause E, Salido GM, Schulz I (1999) Cholecystokinin-evoked Ca<sup>2+</sup> waves in isolated mouse pancreatic acinar cells are modulated by activation of cytosolic phospholipase A(2), phospholipase D, and protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **261**(3): 726-733
- Gorelick FS, Jamieson JD (2006) *Structure-function relations in the pancreatic acinar cell*, Vol. 2, 4 edn. London: Elsevier.
- Gousset-Dupont A, Robert V, Grynberg A, Lacour B, Tardivel S (2007) The effect of n-3 PUFA on eNOS activity and expression in Ea hy 926 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **76**(3): 131-139
- Grady T, Liang P, Ernst SA, Logsdon CD (1997) Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology* **113**(6): 1966-1975
- Grady T, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM, Gorelick FS (1998) Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am J Physiol* **275**(5 Pt 1): G1010-1017
- Grady T, Saluja A, Kaiser A, Steer M (1996) Edema and intrapancreatic trypsinogen activation precede glutathione depletion during caerulein pancreatitis. *Am J Physiol* **271**(1 Pt 1): G20-26
- Granados MP, Salido GM, Pariente JA, Gonzalez A (2004) Generation of ROS in response to CCK-8 stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *Mitochondrion* **3**(5): 285-296
- Granger J, Remick D (2005) Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock* **24 Suppl 1**: 45-51
- Gray MA, Greenwell JR, Argent BE (1988) Secretin-regulated chloride channel on the apical plasma membrane of pancreatic duct cells. *J Membr Biol* **105**(2): 131-142
- Green DR (2003) Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunol Rev* **193**: 5-9
- Grossman MI (1977) Physiological effects of gastrointestinal hormones. *Fed Proc* **36**(7): 1930-1932
- Grovum WL (1981) Factors affecting the voluntary intake of food by sheep. 3. The effect of intravenous infusions of gastrin, cholecystokinin and secretin on motility of the reticulo-rumen and intake. *Br J Nutr* **45**(1): 183-201

Gruenbaum Y, Goldman RD, Meyuhas R, Mills E, Margalit A, Fridkin A, Dayani Y, Prokocimer M, Enosh A (2003) The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int Rev Cytol* **226**: 1-62

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**(6): 3440-3450

Gukovskaya AS, Gukovsky I, Jung Y, Mouria M, Pandol SJ (2002a) Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. Roles in cell injury processes of pancreatitis. *J Biol Chem* **277**(25): 22595-22604

Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ (1997) Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor- $\alpha$ . Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* **100**(7): 1853-1862

Gukovskaya AS, Vaquero E, Zaninovic V, Gorelick FS, Lusic AJ, Brennan ML, Holland S, Pandol SJ (2002b) Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology* **122**(4): 974-984

Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ (1998) Early NF- $\kappa$ B activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* **275**(6 Pt 1): G1402-1414

Gurda GT, Guo L, Lee SH, Molkentin JD, Williams JA (2008) Cholecystokinin activates pancreatic calcineurin-NFAT signaling in vitro and in vivo. *Mol Biol Cell* **19**(1): 198-206

Gutiérrez-Ríos P (2009) Modulación por las distintas fuentes grasas de la dieta (aceite de oliva, girasol y pescado) de la apoptosis inducida por adriamicina: Papel de la mitocondria. Universidad de Granada, Granada

Guyton AC, Hall JE (2001) *Tratado de fisiología médica*, 10 edn.: Mc Graw Hill Interamericana.

Hahm KB, Kim JH, You BM, Kim YS, Cho SW, Yim H, Ahn BO, Kim WB (1998) Induction of apoptosis with an extract of *Artemisia asiatica* attenuates the severity of cerulein-induced pancreatitis in rats. *Pancreas* **17**(2): 153-157

Hamdi HK, Castellon R (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun* **334**(3): 769-778

Hampoelz B, Knoblich JA (2004) Heterotrimeric G proteins: new tricks for an old dog. *Cell* **119**(4): 453-456

Hampton MB, Orrenius S (1998) Redox regulation of apoptotic cell death in the immune system. *Toxicol Lett* **102-103**: 355-358

Han B, Logsdon CD (1999) Cholecystokinin induction of mob-1 chemokine expression in pancreatic acinar cells requires NF- $\kappa$ B activation. *Am J Physiol* **277**(1 Pt 1): C74-82

Han B, Logsdon CD (2000) 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**(2): C344-351



- Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H (2009) Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* **59**(1): 45-53
- Hand BH (1963) An anatomical study of the choledochoduodenal area. *Br J Surg* **50**: 486-494
- Harder T (2004) Lipid raft domains and protein networks in T-cell receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* **16**(3): 353-359
- Harper AA, Hood AJ, Mushens J, Smy JR (1979) Pancreatone, an inhibitor of pancreatic secretion in extracts of ileal and colonic mucosa. *J Physiol* **292**: 455-467
- Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP (2009) MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* **19**(2): 81-88
- Hefner Y, Borsch-Haubold AG, Murakami M, Wilde JI, Pasquet S, Schieltz D, Ghomashchi F, Yates JR, 3rd, Armstrong CG, Paterson A, Cohen P, Fukunaga R, Hunter T, Kudo I, Watson SP, Gelb MH (2000) Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases. *J Biol Chem* **275**(48): 37542-37551
- Heidehain M (1921) Über die teilungsfähigen Drüseneinheiten oder Asenomeren, sowie über die Grundbegriffe der morphologischen Systemlehre. *Arch Entw Mech Org* **49**: 178
- Heidemann C, Schulze MB, Franco OH, van Dam RM, Mantzoros CS, Hu FB (2008) Dietary patterns and risk of mortality from cardiovascular disease, cancer, and all causes in a prospective cohort of women. *Circulation* **118**(3): 230-237
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**(Pt 1): 1-20
- Hietaranta AJ, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML (2001) Relationship between NF-kappaB and trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* **280**(1): 388-395
- Higy M, Junne T, Spiess M (2004) Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **43**(40): 12716-12722
- Hilgemann DW, Yaradanakul A, Wang Y, Fuster D (2006) Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* **17** Suppl 1: S47-S56
- Hoene M, Weigert C (2008) The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance. *Obes Rev* **9**(1): 20-29
- Holst JJ (1986) *Neural regulation of pancreatic exocrine function. In The Exocrine Pancreas, Biology Pathobiology and Diseases*, New York: Raven Press.

- Horton AA, Fairhurst S (1987) Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* **18**(1): 27-79
- Hoshi H, Logsdon CD (1993) Direct trophic effects of fibroblast growth factors on rat pancreatic acinar cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **196**(3): 1202-1207
- Hsu S, Schmid A, Sternfeld L, Anderie I, Solis G, Hofer HW, Schulz I (2003) Tyrosine phosphatase PTP1B modulates store-operated calcium influx. *Cell Signal* **15**(12): 1149-1156
- Hu FB, Willett WC (2002) Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA* **288**(20): 2569-2578
- Huang DC, Strasser A (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**(6): 839-842
- Huang X, Sheu L, Kang Y, Eto Y, Kojima I, Gaisano HY (2002) Effects of selective endocrine or exocrine induction of AR42J on SNARE and Munc18 protein expression. *Pancreas* **25**(4): e56-63
- Hughes CB, Grewal HP, Gaber LW, Kotb M, El-din AB, Mann L, Gaber AO (1996) Anti-TNFalpha therapy improves survival and ameliorates the pathophysiologic sequelae in acute pancreatitis in the rat. *Am J Surg* **171**(2): 274-280
- Ikeda Y, Fukuoka S (2003) 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**(4): 943-947
- Jang S, Kelley KW, Johnson RW (2008) Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(21): 7534-7539
- Jensen RT (1994) *Receptors on pancreatic acinar cells.*, 3 edn. New York: Raven Press.
- Jensen RT, Gardner JD (1981) Identification and characterization of receptors for secretagogues on pancreatic acinar cells. *Fed Proc* **40**(10): 2486-2496
- Jessop NWH, R.J. (1980) Characteristics of two rat pancreatic exocrine cell lines derived from transplantable tumors. *In Vitro* **16**
- Jiang C, Ting AT, Seed B (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**(6662): 82-86
- Jiang PH, Motoo Y, Iovanna JL, Pebusque MJ, Xie MJ, Okada G, Sawabu N (2004) 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**(4): 205-216
- Johnson LR, Barret KE, Chishan FK, Merchant JL, Said HM, Wood JD (2006) *Physiology of the gastrointestinal tract*, Vol. 2, 4 edn. London: Elsevier.
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**(2): 153-164

- Joza N, Kroemer G, Penninger JM (2002) Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet* **18**(3): 142-149
- Ju KD, Lim JW, Kim KH, Kim H (2011) Potential role of NADPH oxidase-mediated activation of Jak2/Stat3 and mitogen-activated protein kinases and expression of TGF-beta1 in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Inflamm Res*
- Jump DB (2002) Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol* **13**(2): 155-164
- Jung KH, Hong SW, Zheng HM, Lee HS, Lee H, Lee DH, Lee SY, Hong SS (2010) Melatonin ameliorates cerulein-induced pancreatitis by the modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB in rats. *J Pineal Res* **48**(3): 239-250
- Jungermann J, Lerch MM, Weidenbach H, Lutz MP, Kruger B, Adler G (1995) Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation. *Am J Physiol* **268**(2 Pt 1): G328-338
- Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alpini G (2001) Regulation of cholangiocyte bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**(3): G612-625
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-663
- Karman RJ, Gupta MP, Garcia JG, Hart CM (1997) Exogenous fatty acids modulate the functional and cytotoxic responses of cultured pulmonary artery endothelial cells to oxidant stress. *J Lab Clin Med* **129**(5): 548-556
- Kazanjian KK, Towfigh S, McFadden DW (2003) Peptide YY exhibits a mitogenic effect on pancreatic cells while improving acute pancreatitis in vitro. *J Surg Res* **114**(1): 95-99
- Kern HF (1986) *Fine structure of the human exocrine pancreas*, New York: Raven Press.
- Keys A (1980) *Seven Countries: A multivariate analysis of diet and coronary heart disease*. Cambridge: Harvard University Press
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, et al. (1986) The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* **124**(6): 903-915
- Khanal P, Oh WK, Yun HJ, Namgoong GM, Ahn SG, Kwon SM, Choi HK, Choi HS (2011) p-HPEA-EDA, a phenolic compound of virgin olive oil, activates AMP-activated protein kinase to inhibit carcinogenesis. *Carcinogenesis* **32**(4): 545-553
- Kilian M, Heukamp I, Gregor JI, Bretthauer C, Walz MK, Jacobi CA, Lochs H, Schimke I, Guski H, Wenger FA (2006) 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**(1): 57-63

Kilian M, Heukamp I, Gregor JJ, Schimke I, Kristiansen G, Wenger FA (2009) Fish Oil, but Not Soy Bean or Olive Oil Enriched Infusion Decreases Histopathological Severity of Acute Pancreatitis in Rats Without Affecting Eicosanoid Synthesis. *Inflammation*

Kim JS, Qian T, Lemasters JJ (2003) Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology* **124**(2): 494-503

Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**(6972): 360-364

Klein E, Salinas A, Shemesh E, Dreiling DA (1988) Effects of autonomic denervation on canine exocrine pancreatic secretion and blood flow. *Int J Pancreatol* **3**(2-3): 165-170

Kleizen B, Braakman I (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* **16**(4): 343-349

Kloppel G, Dreyer T, Willemer S, Kern HF, Adler G (1986) Human acute pancreatitis: its pathogenesis in the light of immunocytochemical and ultrastructural findings in acinar cells. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **409**(6): 791-803

Kloppel G, Maillet B (1993) Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* **8**(6): 659-670

Kohyama N, Nagata T, Fujimoto S, Sekiya K (1997) Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**(2): 347-350

Kok FJ, Kromhout D (2004) Atherosclerosis--epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. *Eur J Nutr* **43** Suppl 1: I/2-5

Kolakowski LF, Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **2**(1): 1-7

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**(5): 1415-1420

Koppenol WH (1993) The centennial of the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* **15**(6): 645-651

Kouris-Blazos A, Gnardellis C, Wahlqvist ML, Trichopoulos D, Lukito W, Trichopoulou A (1999) Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to other populations? A cohort study in Melbourne, Australia. *Br J Nutr* **82**(1): 57-61

Kremer JM (2000) n-3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *Am J Clin Nutr* **71**(1 Suppl): 349S-351S

Kristiansen K (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* **103**(1): 21-80

Kroemer G (2003) Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* **304**(3): 433-435

Kruger B, Albrecht E, Lerch MM (2000) The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am J Pathol* **157**(1): 43-50

Kumari S, Dash D (2011) Melatonin elevates intracellular free calcium in human platelets by inositol 1,4,5-trisphosphate independent mechanism. *FEBS Lett*

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685

Lagerlöf HO (1942) Pancreatic function and pancreatic disease studied by means of secretin. *Acta Med Scand* **128**: S17-S33

Lai JK, Cheng CH, Ko WH, Leung PS (2005) Ghrelin system in pancreatic AR42J cells: its ligand stimulation evokes calcium signalling through ghrelin receptors. *Int J Biochem Cell Biol* **37**(4): 887-900

Lajas AI, Sierra V, Camello PJ, Salido GM, Pariente JA (2001) Vanadate inhibits the calcium extrusion in rat pancreatic acinar cells. *Cell Signal* **13**(6): 451-456

Lam M, Dubyak G, Chen L, Nunez G, Miesfeld RL, Distelhorst CW (1994) Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(14): 6569-6573

Lambert JD, Sang S, Yang CS (2007) Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chem Res Toxicol* **20**(4): 583-585

Lampel M, Kern HF (1977) Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* **373**(2): 97-117

Landau Z, Forti E, Alcala M, Birk RZ (2006) Palmitate induced lipoapoptosis of exocrine pancreas AR42J cells. *Apoptosis* **11**(5): 717-724

Lee C, Barnett J, Reaven PD (1998) Liposomes enriched in oleic acid are less susceptible to oxidation and have less proinflammatory activity when exposed to oxidizing conditions. *J Lipid Res* **39**(6): 1239-1247

Lee CK, Badros A, Barlogie B, Morris C, Zangari M, Fassas A, van Rhee F, Cottler-Fox M, Jacobson J, Thertulien R, Muwalla F, Mazher S, Anaissie E, Tricot G (2003) Prognostic factors in allogeneic transplantation for patients with high-risk multiple myeloma after reduced intensity conditioning. *Exp Hematol* **31**(1): 73-80

Lee SM, Chen L, Chow BK, Yung WH (2005) Endogenous release and multiple actions of secretin in the rat cerebellum. *Neuroscience* **134**(2): 377-386

Leger CL, Carbonneau MA, Michel F, Mas E, Monnier L, Cristol JP, Descomps B (2005) A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes. *Eur J Clin Nutr* **59**(5): 727-730

- Leist M, Raab B, Maurer S, Rosick U, Brigelius-Flohe R (1996) Conventional cell culture media do not adequately supply cells with antioxidants and thus facilitate peroxide-induced genotoxicity. *Free Radic Biol Med* **21**(3): 297-306
- Lemasters JJ (1999) V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* **276**(1 Pt 1): G1-6
- Leonard WJ, O'Shea JJ (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* **16**: 293-322
- Lepage G, Roy CC (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* **27**(1): 114-120
- Lerch MM, Adler G (1994) Experimental animal models of acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* **15**(3): 159-170
- Lerch MM, Saluja AK, Dawra R, Ramarao P, Saluja M, Steer ML (1992) Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. *Gastroenterology* **103**(1): 205-213
- Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M, Ruckauer K, Andreesen R, Farthmann EH, Scholmerich J (1991) Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* **101**(3): 782-785
- Li Q, Tan L, Wang C, Li N, Li Y, Xu G, Li J (2006) Polyunsaturated eicosapentaenoic acid changes lipid composition in lipid rafts. *Eur J Nutr* **45**(3): 144-151
- Li Y, Owyang C (1994) Endogenous cholecystokinin stimulates pancreatic enzyme secretion via vagal afferent pathway in rats. *Gastroenterology* **107**(2): 525-531
- Liang T, Liu TF, Xue DB, Sun B, Shi LJ (2008) Different cell death modes of pancreatic acinar cells on macrophage activation in rats. *Chin Med J (Engl)* **121**(19): 1920-1924
- Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M, Wylie-Rosett J (2006) Summary of American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendations revision 2006. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(10): 2186-2191
- Lipsky PE (2000) [COX-2--what are the clinical implications?]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **23**(6): 679-682
- Logsdon CD, Moessner J, Williams JA, Goldfine ID (1985) Glucocorticoids increase amylase mRNA levels, secretory organelles, and secretion in pancreatic acinar AR42J cells. *J Cell Biol* **100**(4): 1200-1208
- Logsdon CD, Perot KJ, McDonald AR (1987) Mechanism of glucocorticoid-induced increase in pancreatic amylase gene transcription. *J Biol Chem* **262**(32): 15765-15769

Logston CD (1994) *Molecular Structure and Function of G-Protein Linked Receptors*, New York: Raven Press.

Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS (1975) Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. *Am J Pathol* **79**(3): 465-480

Long J, Song N, Liu XP, Guo KJ, Guo RX (2005) Nuclear factor-kappaB activation on the reactive oxygen species in acute necrotizing pancreatic rats. *World J Gastroenterol* **11**(27): 4277-4280

Long YM, Chen K, Liu XJ, Xie WR, Wang H (2009) Cell-permeable Tat-NBD peptide attenuates rat pancreatitis and acinus cell inflammation response. *World J Gastroenterol* **15**(5): 561-569

Longnecker DS, Lilja HS, French J, Kuhlmann E, Noll W (1979) Transplantation of azaserine-induced carcinomas of pancreas in rats. *Cancer Lett* **7**(4): 197-202

López-Millán MB, Santana C, Audi N, Martínez-Burgos MA, Mesa MD, Martínez-Victoria E, Mañas M, Yago MD (2009). Modification of membrane fatty acid composition of pancreatic AR42J cells influences bile acid-induced ca<sup>2+</sup> responses. XXXV Congreso de la SECF; XXXV Congreso de la SECF.

Lu L, Logsdon CD (1992) CCK, bombesin, and carbachol stimulate c-fos, c-jun, and c-myc oncogene expression in rat pancreatic acini. *Am J Physiol* **263**(3 Pt 1): G327-332

Luthen R, Niederau C, Grendell JH (1995) Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats. *Am J Physiol* **268**(4 Pt 1): G592-604

Madesh M, Bhaskar L, Balasubramanian KA (1997) Enterocyte viability and mitochondrial function after graded intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Mol Cell Biochem* **167**(1-2): 81-87

Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y (2000) Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17): 9487-9492

Maiuri MC, De Stefano D, Di Meglio P, Irace C, Savarese M, Sacchi R, Cinelli MP, Carnuccio R (2005) Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **371**(6): 457-465

Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**(1): 3-15

Malleo G, Mazzon E, Siriwardena AK, Cuzzocrea S (2007) Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence. *Shock* **28**(2): 130-140

Mareninova OA, Sung KF, Hong P, Lugea A, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS (2006) Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis. *J Biol Chem* **281**(6): 3370-3381

Marsh WH, Vukov GA, Conradi EC (1988) Acute pancreatitis after cutaneous exposure to an organophosphate insecticide. *Am J Gastroenterol* **83**(10): 1158-1160

Martin SJ, Reutelingsperger CPM, Green DR (1996) Annexin V: a specific probe for apoptotic cells. In *Techniques in apoptosis: A user's guide*, Cotten YG and Martin SJ, eds. London: Portland Press: 107-119

Martinez-Burgos MA, Granados MP, Gonzalez A, Rosado JA, Yago MD, Salido GM, Martinez-Victoria E, Manas M, Pariente JA (2006) Involvement of ryanodine-operated channels in tert-butylhydroperoxide-evoked Ca<sup>2+</sup> mobilisation in pancreatic acinar cells. *J Exp Biol* **209**(Pt 11): 2156-2164

Martinez-Dominguez E, de la Puerta R, Ruiz-Gutierrez V (2001) Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet. *Inflamm Res* **50**: 102-106

Martinez MA, Lajas AI, Yago MD, Redondo PC, Granados MP, Gonzalez A, Rosado JA, Martinez-Victoria E, Manas M, Pariente JA (2004) Dietary virgin olive oil enhances secretagogue-evoked calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Nutrition* **20**(6): 536-541

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

Martinez MA, Yago MD, Martinez-Victoria E, Singh J, Mañas M (2002) Influence of dietary cholesterol on the adaptation of rabbit pancreatic membranes to dietary fat. *Journal of Physiology*: 13P

Maruyama Y, Petersen OH (1994) Delay in granular fusion evoked by repetitive cytosolic Ca<sup>2+</sup> spikes in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Calcium* **16**(5): 419-430

Marx M, Gómez G, Lonovics J, Thompson JC (1987) *Cholecystokinin*. Mc Graw-Hill.

Masamune A, Sakai Y, Satoh A, Fujita M, Yoshida M, Shimosegawa T (2001) Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in AR42J cells. *Pancreas* **22**(1): 75-83

Massaro M, De Caterina R (2002) Vasculoprotective effects of oleic acid: epidemiological background and direct vascular antiatherogenic properties. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **12**(1): 42-51

Mataix J, Gil A (2002) *Libro Blanco de los Omega-3. Los acidos grasos poliinsaturados Omega 3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en al salud*. Panamericana.

Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Manas M (1998) Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* **24**(4): 511-521



Matozaki T, Martinez J, Williams JA (1989) A new CCK analogue differentiates two functionally distinct CCK receptors in rat and mouse pancreatic acini. *Am J Physiol* **257**(4 Pt 1): G594-600

Matozaki T, Williams JA (1989) Multiple sources of 1,2-diacylglycerol in isolated rat pancreatic acini stimulated by cholecystokinin. Involvement of phosphatidylinositol bisphosphate and phosphatidylcholine hydrolysis. *J Biol Chem* **264**(25): 14729-14734

Maxfield FR, Tabas I (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**(7068): 612-621

May RJ, Conlon TP, Erspamer V, Gardner JD (1978) Actions of peptides isolated from amphibian skin on pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* **235**(2): E112-118

Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG (2000) Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut* **47**(4): 546-552

Mayser P, Mrowietz U, Arenberger P, Bartak P, Buchvald J, Christophers E, Jablonska S, Salmhofer W, Schill WB, Kramer HJ, Schlotzer E, Mayer K, Seeger W, Grimminger F (1998) Omega-3 fatty acid-based lipid infusion in patients with chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *J Am Acad Dermatol* **38**(4): 539-547

McKay CJ, Buter A (2003) Natural history of organ failure in acute pancreatitis. *Pancreatology* **3**(2): 111-114

Melo CM, Morais TC, Tome AR, Brito GA, Chaves MH, Rao VS, Santos FA (2011) Anti-inflammatory effect of alpha,beta-amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflamm Res* **60**(7): 673-681

Michels G, Khan IF, Endres-Becker J, Rottlaender D, Herzig S, Ruhparwar A, Wahlers T, Hoppe UC (2009) Regulation of the human cardiac mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake by 2 different voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Circulation* **119**(18): 2435-2443

Mikkat U, Damm I, Kirchhoff F, Albrecht E, Nebe B, Jonas L (2001) Effects of lectins on CCK-8-stimulated enzyme secretion and differentiation of the rat pancreatic cell line AR42J. *Pancreas* **23**(4): 368-374

Mikoshiba K (1997) The InsP3 receptor and intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Curr Opin Neurobiol* **7**(3): 339-345

Mishra R, Simonson MS (2005) 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**(1): 2

Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J (2003) Pancreatitis. *Lancet* **361**(9367): 1447-1455

Mithofer K, Fernandez-del Castillo C, Frick TW, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL (1995) Acute hypercalcemia causes acute pancreatitis and ectopic trypsinogen activation in the rat. *Gastroenterology* **109**(1): 239-246

- Mithofer K, Fernandez-del Castillo C, Rattner D, Warshaw AL (1998) Subcellular kinetics of early trypsinogen activation in acute rodent pancreatitis. *Am J Physiol* **274**(1 Pt 1): G71-79
- Mooren F, Hlouschek V, Finkes T, Turi S, Weber IA, Singh J, Domschke W, Schnekenburger J, Kruger B, Lerch MM (2003) Early changes in pancreatic acinar cell calcium signaling after pancreatic duct obstruction. *J Biol Chem* **278**(11): 9361-9369
- Moran TH, Smith GP, Hostetler AM, McHugh PR (1987) Transport of cholecystikinin (CCK) binding sites in subdiaphragmatic vagal branches. *Brain Res* **415**(1): 149-152
- Moreau B, Nelson C, Parekh AB (2006) Biphasic regulation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake by cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration. *Curr Biol* **16**(16): 1672-1677
- Moreno JJ, Carbonell T, Sanchez T, Miret S, Mitjavila MT (2001) Olive oil decreases both oxidative stress and the production of arachidonic acid metabolites by the prostaglandin G/H synthase pathway in rat macrophages. *J Nutr* **131**(8): 2145-2149
- Morisset J, Wood J, Solomon TE, Larose L (1987) Muscarinic receptors and amylase secretion of rat pancreatic acini during cerulein-induced acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* **32**(8): 872-877
- Morita O, Kirkpatrick JB, Tamaki Y, Chengelis CP, Beck MJ, Bruner RH (2009) Safety assessment of heat-sterilized green tea catechin preparation: a 6-month repeat-dose study in rats. *Food Chem Toxicol* **47**(8): 1760-1770
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63
- Motoo Y, Su SB, Xie MJ, Mouri H, Taga H, Sawabu N (2001) Effect of herbal medicine keishi-to (TJ-45) and its components on rat pancreatic acinar cell injuries in vivo and in vitro. *Pancreatology* **1**(2): 102-109
- Muallem S (1989) Calcium transport pathways of pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol* **51**: 83-105
- Muallem S, Kwiatkowska K, Xu X, Yin HL (1995) Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol* **128**(4): 589-598
- Muallem S, Pandol SJ, Beeker TG (1989) Modulation of agonist-activated calcium influx by extracellular pH in rat pancreatic acini. *Am J Physiol* **257**(6 Pt 1): G917-924
- Mukherjee R, Criddle DN, Gukovskaya A, Pandol S, Petersen OH, Sutton R (2008) Mitochondrial injury in pancreatitis. *Cell Calcium* **44**(1): 14-23
- Murakami M, Kudo I (2004) Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E<sub>2</sub>-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* **43**(1): 3-35
- Murty VS, Penning TM (1992) Characterization of mercapturic acid and glutathionyl conjugates of benzo[a]pyrene-7,8-dione by two-dimensional NMR. *Bioconjug Chem* **3**(3): 218-224

Nagase H, Fukuyama H, Tanaka M, Kawane K, Nagata S (2003) Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation. *Cell Death Differ* **10**(1): 142-143

Nakagawa M, Bondy GP, Waisman D, Minshall D, Hogg JC, van Eeden SF (1999) The effect of glucocorticoids on the expression of L-selectin on polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **93**(8): 2730-2737

Nakamura Y, Do JH, Yuan J, Odínokova IV, Mareninova O, Gukovskaya AS, Pandol SJ (2010) Inflammatory cells regulate p53 and caspases in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**(1): G92-100

Nakayama S, Kretsinger RH (1994) Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**: 473-507

Nakbi A, Tayeb W, Dabbou S, Issaoui M, Grissa AK, Attia N, Hammami M (2010) Dietary olive oil effect on antioxidant status and fatty acid profile in the erythrocyte of 2,4-D-exposed rats. *Lipids Health Dis* **9**: 89

Neelands PJ, Clandinin MT (1983) Diet fat influences liver plasma-membrane lipid composition and glucagon-stimulated adenylate cyclase activity. *Biochem J* **212**(3): 573-583

Nerad JL, Griffiths JK, Van der Meer JW, Endres S, Poutsika DD, Keusch GT, Bennis M, Salam MA, Dinarello CA, Cannon JG (1992) Interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-1 receptor antagonist, and TNF alpha production in whole blood. *J Leukoc Biol* **52**(6): 687-692

Nestle M (1995) Mediterranean diets: historical and research overview. *Am J Clin Nutr* **61**(6 Suppl): 1313S-1320S

Nicholson DW, Thornberry NA (2003) Apoptosis. Life and death decisions. *Science* **299**(5604): 214-215

Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH (1985) Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology* **88**(5 Pt 1): 1192-1204

Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**(5082): 607-614

Norman J (1998) The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* **175**(1): 76-83

Norman J, Franz M, Riker A, Gower WR (1994) Rapid Elevation of Cytokines During Acute Pancreatitis and Their Origination Within the Pancreas. *Surgical Forum* **XLV**: 148-160

Norman JG, Fink GW, Franz MG (1995) Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg* **130**(9): 966-970

- Notarnicola M, Pisanti S, Tutino V, Bocale D, Rotelli MT, Gentile A, Memeo V, Bifulco M, Perri E, Caruso MG (2011) Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells. *Genes Nutr* **6**(1): 63-69
- O'Donohue TL, Charlton CG, Miller RL, Boden G, Jacobowitz DM (1981) Identification, characterization, and distribution of secretin immunoreactivity in rat and pig brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(8): 5221-5224
- Odinokova IV, Sung KF, Mareninova OA, Hermann K, Gukovsky I, Gukovskaya AS (2008) Mitochondrial mechanisms of death responses in pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* **23 Suppl 1**: S25-30
- Ohlsson K, Eddeland A (1975) Release of proteolytic enzymes in bile-induced pancreatitis in dogs. *Gastroenterology* **69**(3): 668-675
- Ohmoto K, Yamamoto S (2005) Serum interleukin-6 and interleukin-10 in patients with acute pancreatitis: clinical implications. *Hepatogastroenterology* **52**(64): 990-994
- Okada N, Ohshio G, Tanaka T, Wang ZH, Doi R, Imamura M (1998) Intracellular Ca<sup>2+</sup> response of pancreatic acini in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Hepatogastroenterology* **45**(21): 840-845
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(7): 552-565
- Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalter B, Bartsch H (2000) Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol* **38**(8): 647-659
- Ozkan E, Akyuz C, Sehirli AO, Topaloglu U, Ercan F, Sener G (2010) Montelukast, a selective cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, reduces cerulein-induced pancreatic injury in rats. *Pancreas* **39**(7): 1041-1046
- Padanilam BJ (2003) Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**(4): F608-627
- Padfield PJ, Panesar N (1998) Cholecystokinin octapeptide inhibits Ca<sup>2+</sup>-dependent amylase secretion from permeabilized pancreatic acini by blocking the MgATP-dependent priming of exocytosis. *Biochem J* **330 ( Pt 1)**: 329-334
- Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**(49): 6853-6866
- Palmerini CA, Carlini E, Saccardi C, Servili M, Montedoro G, Arienti G (2005) Activity of olive oil phenols on lymphomonocyte cytosolic calcium. *J Nutr Biochem* **16**(2): 109-113
- Pandol SJ (2006) Acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* **22**(5): 481-486
- Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA (2007) Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology* **132**(3): 1127-1151

- Papachristou GI, Clermont G, Sharma A, Yadav D, Whitcomb DC (2007) Risk and markers of severe acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* **36**(2): 277-296, viii
- Parekh AB, Putney JWJ (2005) Regulation of the calcium release -activated calcium current IC<sub>RAC</sub>. *Physiol Rev* **85**: 757-810
- Pariante JA, Redondo PC, Granados MP, Lajas AI, Gonzalez A, Rosado JA, Salido GM (2003) Calcium signaling in non-excitabile cells. *E C Qua L* **1**: 29-43
- Parola AH (1993) *Membrane Lipid-Protein Interactions*, New York and Cambridge Balaban Press VCH.
- Pattison DJ, Winyard PG (2008) Dietary antioxidants in inflammatory arthritis: do they have any role in etiology or therapy? *Nat Clin Pract Rheumatol* **4**(11): 590-596
- Penning TM, Burczynski ME, Hung CF, McCoull KD, Palackal NT, Tsuruda LS (1999) Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol* **12**(1): 1-18
- Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Vina J, Lopez-Rodas G, Sastre J (2006) Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Curr Med Chem* **13**(23): 2775-2787
- Perez-Jimenez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J (2007) The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol Nutr Food Res* **51**(10): 1199-1208
- Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK (2010) MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca<sup>2+</sup> uptake. *Nature* **467**(7313): 291-296
- Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V (2006) The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem* **17**(7): 429-445
- Petersen OH (2005) Ca<sup>2+</sup> signalling and Ca<sup>2+</sup>-activated ion channels in exocrine acinar cells. *Cell Calcium* **38**(3-4): 171-200
- Petersen OH, Petersen CC, Kasai H (1994) Calcium and hormone action. *Annu Rev Physiol* **56**: 297-319
- Petersen OH, Tepikin AV (2008) Polarized calcium signaling in exocrine gland cells. *Annu Rev Physiol* **70**: 273-299
- Petersen OH, Tepikin AV, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Sutton R, Criddle DN (2009) Fatty acids, alcohol and fatty acid ethyl esters: toxic Ca<sup>2+</sup> signal generation and pancreatitis. *Cell Calcium* **45**(6): 634-642
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 639-650

- Piiper A, Leser J, Lutz MP, Beil M, Zeuzem S (2001) Subcellular distribution and function of Rab3A-D in pancreatic acinar AR42J cells. *Biochem Biophys Res Commun* **287**(3): 746-751
- Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R (2008) Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* **27**(50): 6407-6418
- Pirhonen J, Sareneva T, Kurimoto M, Julkunen I, Matikainen S (1999) Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. *J Immunol* **162**(12): 7322-7329
- Polster BM, Kinnally KW, Fiskum G (2001) BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. *J Biol Chem* **276**(41): 37887-37894
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* **74**(3): 595-636
- Putney JW, Jr. (2005) Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J Cell Biol* **169**(3): 381-382
- Quiles JL, Farquharson AJ, Simpson DK, Grant I, Wahle KW (2002) Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br J Nutr* **88**(3): 225-234; discussion 223-224
- Quiles JL, Huertas JR, Manas M, Battino M, Mataix J (1999a) Physical exercise affects the lipid profile of mitochondrial membranes in rats fed with virgin olive oil or sunflower oil. *Br J Nutr* **81**(1): 21-24
- Quiles JL, Huertas JR, Manas M, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J (1999b) Oxidative stress induced by exercise and dietary fat modulates the coenzyme Q and vitamin A balance between plasma and mitochondria. *Int J Vitam Nutr Res* **69**(4): 243-249
- Quiles JL, Huertas JR, Manas M, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J (2001) Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat. *J Bioenerg Biomembr* **33**(2): 127-134
- Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Huertas JR, Mataix J (2006) Age-related mitochondrial DNA deletion in rat liver depends on dietary fat unsaturation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**(2): 107-114
- Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Huertas JR, Ibanez S, Gomez JA, Battino M, Mataix J (1999c) Olive oil supplemented with vitamin E affects mitochondrial coenzyme Q levels in liver of rats after an oxidative stress induced by adriamycin. *Biofactors* **9**(2-4): 331-336
- Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Ibanez S, Alfonso Gonzalez J, Duthie GG, Huertas JR, Mataix J (1999d) Vitamin E supplementation increases the stability and the in vivo antioxidant capacity of refined olive oil. *Free Radic Res* **31 Suppl**: S129-135
- Raederstorff D (2009) Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *Int J Vitam Nutr Res* **79**(3): 152-165

- Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Pontoni G, Racioppi L, Manna C, Galletti P, Zappia V (2000) Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **278**(3): 733-739
- Rakonczay Z, Jr., Hegyi P, Takacs T, McCarroll J, Saluja AK (2008) The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* **57**(2): 259-267
- Ramudo L, Manso MA, Vicente S, De Dios I (2005) Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis. Effect of N-acetyl cysteine. *Cytokine* **32**(3-4): 125-131
- Ramudo L, Yubero S, Manso MA, Recio JS, Weruaga E, De Dios I (2010) Effect of dexamethasone on peripheral blood leukocyte immune response in bile-pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. *Steroids* **75**(4-5): 362-367
- Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, Petersen OH (2000) Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13126-13131
- Razquin C, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA, Mitjavila MT, Estruch R, Marti A (2009) A 3 years follow-up of a Mediterranean diet rich in virgin olive oil is associated with high plasma antioxidant capacity and reduced body weight gain. *Eur J Clin Nutr* **63**(12): 1387-1393
- Regimbald-Dumas Y, Arguin G, Fregeau MO, Guillemette G (2007) cAMP-dependent protein kinase enhances inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release in AR4-2J cells. *J Cell Biochem* **101**(3): 609-618
- Reinheckel T, Prause J, Nedelew B, Augustin W, Schulz HU, Lippert H, Halangk W (1999) Oxidative stress affects pancreatic proteins during the early pathogenesis of rat caerulein pancreatitis. *Digestion* **60**(1): 56-62
- Renaud S, de Lorgeril M, Delaye J, Guidollet J, Jacquard F, Mamelle N, Martin JL, Monjaud I, Salen P, Toubol P (1995) Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* **61**(6 Suppl): 1360S-1367S
- Ribet M, Quandalle P, Chambon JP, Giard-Lefevre S, Pruvot FR (1985) [Surgery of perforated duodenal ulcer. Treatment of the perforation or the ulcer?]. *J Chir (Paris)* **122**(12): 671-673
- Ricketts J, Brannon PM (1994) Amount and type of dietary fat regulate pancreatic lipase gene expression in rats. *J Nutr* **124**(8): 1166-1171
- Rivera-Barreno R, del Castillo-Vaquero A, Salido GM, Gonzalez A (2010) Effect of cinnamtannin B-1 on cholecystokinin-8-evoked responses in mouse pancreatic acinar cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **37**(10): 980-988
- Rizvi IA, Robinson K, McFadden DW, Riggs DR, Jackson BJ, Vona-Davis L (2006) Peptide YY reverses TNF-alpha induced transcription factor binding of interferon regulatory factor-1 and p53 in pancreatic acinar cells. *J Surg Res* **136**(1): 25-30

- Rizzuto R, Pozzan T (2006) Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* **86**(1): 369-408
- Robinson K, Vona-Davis L, Riggs D, Jackson B, McFadden D (2006) Peptide YY attenuates STAT1 and STAT3 activation induced by TNF-alpha in acinar cell line AR42J. *J Am Coll Surg* **202**(5): 788-796
- Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW (1997) Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* **112**(3): 960-967
- Rosado JA, Gonzalez A, Salido GM, Pariente JA (2002) Effects of reactive oxygen species on actin filament polymerisation and amylase secretion in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* **14**(6): 547-556
- Rosado JA, Sage SO (2002) *Platelet signalling: calcium movements.*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Rosewicz S, Lewis LD, Wang XY, Liddle RA, Logsdon CD (1989) Pancreatic digestive enzyme gene expression: effects of CCK and soybean trypsin inhibitor. *Am J Physiol* **256**(4 Pt 1): G733-738
- Rosewicz S, Riecken EO, Wiedenmann B (1992) The amphicrine pancreatic cell line AR42J: a model system for combined studies on exocrine and endocrine secretion. *Clin Invest* **70**(3-4): 205-209
- Roth EM, Harris WS (2010) Fish oil for primary and secondary prevention of coronary heart disease. *Curr Atheroscler Rep* **12**(1): 66-72
- Rudel T, Bokoch GM (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* **276**(5318): 1571-1574
- Sabb JE, Godfrey PM, Brannon PM (1986) Adaptive response of rat pancreatic lipase to dietary fat: effects of amount and type of fat. *J Nutr* **116**(5): 892-899
- Saccani S, Pantano S, Natoli G (2003) Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol Cell* **11**(6): 1563-1574
- Saluja A, Saito I, Saluja M, Houlihan MJ, Powers RE, Meldolesi J, Steer M (1985) In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. *Am J Physiol* **249**(6 Pt 1): G702-710
- Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Frossard JL, Steer ML (1999) Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *Am J Physiol* **276**(4 Pt 1): G835-842
- Saluja AK, Lerch MM, Phillips PA, Dudeja V (2007) Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? *Annu Rev Physiol* **69**: 249-269



- Saluja AK, Saluja M, Printz H, Zaverchnik A, Sengupta A, Steer ML (1989) Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8968-8971
- Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, Gukovsky S, Sisk A, Braquet P, Pandol SJ, Poucell-Hatton S (1996) The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. *Gastroenterology* **111**(4): 1081-1091
- Santana CV, López-Millán MB, Martínez-Burgos MA, Mañas M, Martínez-Victoria E, Yago MD (2010). Influence of membrane fatty acid composition on cell viability and lipid peroxidation in a cell model (AR42J) of cerulein-induced acute pancreatitis. *Proceedings of the Nutrition Society*; Proceedings of the Nutrition Society.
- Santana CV, López MB, Mañas M, Yago MD (2009). Influence of dietary lipid composition on the pancreatic lipid profile. *AgroFOOD industry hi-tech*; AgroFOOD industry hi-tech.
- Sata N, Klonowski-Stumpe H, Han B, Luthen R, Haussinger D, Niederau C (1999) Supraphysiologic concentrations of cerulein induce apoptosis in the rat pancreatic acinar cell line AR4-2J. *Pancreas* **19**(1): 76-82
- Sato S, Stark HA, Martínez J, Beaven MA, Jensen RT, Gardner JD (1989) Receptor occupation, calcium mobilization, and amylase release in pancreatic acini: effect of CCK-JMV-180. *Am J Physiol* **257**(2 Pt 1): G202-209
- Satoh A, Gukovskaya AS, Edderkaoui M, Daghighian MS, Reeve JR, Jr., Shimosegawa T, Pandol SJ (2005) Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates pancreatitis responses in acinar cells via protein kinase C and proline-rich tyrosine kinase 2. *Gastroenterology* **129**(2): 639-651
- Satoh A, Gukovskaya AS, Nieto JM, Cheng JH, Gukovsky I, Reeve JR, Jr., Shimosegawa T, Pandol SJ (2004) PKC- $\delta$  and - $\epsilon$  regulate NF- $\kappa$ B activation induced by cholecystokinin and TNF- $\alpha$  in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(3): G582-591
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**(6894): 191-195
- Schafer C, Ross SE, Bragado MJ, Groblewski GE, Ernst SA, Williams JA (1998) A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini. *J Biol Chem* **273**(37): 24173-24180
- Schley PD, Brindley DN, Field CJ (2007) (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr* **137**(3): 548-553
- Schmitz G, Ecker J (2008) The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* **47**(2): 147-155
- Schonfeld P, Reiser G (2006) Rotenone-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. *J Biol Chem* **281**(11): 7136-7142
- Schulz I (1981) *Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas*, New York: Raven Press.

- Sen R, Baltimore D (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**(5): 705-716
- Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **28**(5): 815-820
- Shaw AS (2006) Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nat Immunol* **7**(11): 1139-1142
- Shi Y (2004) Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* **117**(7): 855-858
- Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N (2010) VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med* **31**(3): 227-285
- Shureiqi I, Lippman SM (2001) Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Res* **61**(17): 6307-6312
- Sierra F, Torres D (1999) Pancreatitis Aguda: una propuesta clínica basada en la "mejor" evidencia disponible (primera de 2 partes). *Rev Colomb Gastroenterol* **14**: 170-180
- Silvente-Poirot S, Escrieut C, Wank SA (1998) Role of the extracellular domains of the cholecystokinin receptor in agonist binding. *Mol Pharmacol* **54**(2): 364-371
- Silverman N, Maniatis T (2001) NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* **15**(18): 2321-2342
- Simeone DM, Yule DI, Logsdon CD, Williams JA (1995) Ca<sup>2+</sup> signaling through secretagogue and growth factor receptors on pancreatic AR42J cells. *Regul Pept* **55**(2): 197-206
- Simopoulos AP (2009) Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World Rev Nutr Diet* **99**: 1-16
- Simopoulos AP, Childs B (1990) *Genetic variation and nutrition*, Vol. 63: World Rev Nutr Diet.
- Simopoulos AP, Nestel PJ (1997) *Genetic variation and dietary response*, Vol. 80: World Rev Nutr Diet.
- Singh P, Asada I, Owlia A, Collins TJ, Thompson JC (1988) Somatostatin inhibits VIP-stimulated amylase release from perfused guinea pig pancreatic acini. *Am J Physiol* **254**(2 Pt 1): G217-223
- Slater TF, Sawyer B, Strauli UD (1963) *Biochim. Biophys Acta* **77**: 383-393
- Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A (2008) Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ* **337**: a1344

- Song J, Li J, Qiao J, Jain S, Mark Evers B, Chung DH (2009) PKD prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via NF-kappaB and p38 MAPK in RIE-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **378**(3): 610-614
- Song JY, Lim JW, Kim H, Morio T, Kim KH (2003) Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. *J Biol Chem* **278**(38): 36676-36687
- Soriguer F, Rojo-Martinez G, Dobarganes MC, Garcia Almeida JM, Esteva I, Beltran M, Ruiz De Adana MS, Tinahones F, Gomez-Zumaquero JM, Garcia-Fuentes E, Gonzalez-Romero S (2003) Hypertension is related to the degradation of dietary frying oils. *Am J Clin Nutr* **78**(6): 1092-1097
- Soriguer FJ, Tinahones FJ, Monzon A, Pareja A, Rojo-Martinez G, Moreno F, Esteva I, Gomez-Zumaquero JM (2000) 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**(6): 585-594
- Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RM (1999) NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology* **116**(2): 420-430
- Stening GF, Grossman MI (1969) Gastrin-related peptides as stimulants of pancreatic and gastric secretion. *Am J Physiol* **217**(1): 262-266
- Stiefel DJ, Keller PJ (1973) Preparation and some properties of human pancreatic amylase including a comparison with human parotid amylase. *Biochim Biophys Acta* **302**(2): 345-361
- Stojilkovic SS (1998) *Calcium signaling systems*, New York: Oxford Press.
- Storz P, Doppler H, Toker A (2004) Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. *Mol Cell Biol* **24**(7): 2614-2626
- Storz P, Toker A (2003) Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *EMBO J* **22**(1): 109-120
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**: 217-245
- Strehler EE, Treiman M (2004) Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr Mol Med* **4**(3): 323-335
- Stryer L (1995) *Bioquímica*. Reverté.
- Stryjek-Kaminska D, Piiper A, Caspary WF, Zeuzem S (1994) Epidermal growth factor inhibits amylase secretion and activation of phospholipase C in response to calcium-mobilizing secretagogues in rat pancreatic acini. *Z Gastroenterol* **32**(4): 232-235
- Strynadka NC, James MN (1989) Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem* **58**: 951-998

- Supattapone S, Danoff SK, Theibert A, Joseph SK, Steiner J, Snyder SH (1988) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(22): 8747-8750
- Susumu T (1977) *The Pancreas. En: Histology*: McGraw Hill. Company.
- Sutton R, Petersen OH, Pandol SJ (2008) Pancreatitis and calcium signalling: report of an international workshop. *Pancreas* **36**(4): e1-14
- Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N (2000a) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**(4): 645-654
- Suzuki S, Miyasaka K, Jimi A, Funakoshi A (2000b) Induction of acute pancreatitis by cerulein in human IL-6 gene transgenic mice. *Pancreas* **21**(1): 86-92
- Swarovsky B, Steinhilber W, Scheele GA, Kern HF (1988) Coupled induction of exocrine proteins and intracellular compartments involved in the secretory pathway in AR4-2J cells by glucocorticoids. *Eur J Cell Biol* **47**(1): 101-111
- Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. *J Cell Biol* **175**(6): 901-911
- Tadolini B, Cabrini L, Menna C, Pinna GG, Hakim G (1997) Iron (III) stimulation of lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation. *Free Radic Res* **27**(6): 563-576
- Tait SW, Green DR (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 621-632
- Tak PP, Firestein GS (2001) NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* **107**(1): 7-11
- Tando Y, Algul H, Wagner M, Weidenbach H, Adler G, Schmid RM (1999) Caerulein-induced NF-kappaB/Rel activation requires both Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C as messengers. *Am J Physiol* **277**(3 Pt 1): G678-686
- Taylor CW, Richardson A (1991) Structure and function of inositol trisphosphate receptors. *Pharmacol Ther* **51**(1): 97-137
- Tepikin AV, Voronina SG, Gallacher DV, Petersen OH (1992) Acetylcholine-evoked increase in the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration and Ca<sup>2+</sup> extrusion measured simultaneously in single mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* **267**(6): 3569-3572
- Thewke D, Kramer M, Sinensky MS (2000) Transcriptional homeostatic control of membrane lipid composition. *Biochem Biophys Res Commun* **273**(1): 1-4
- Thorn P, Gerasimenko O, Petersen OH (1994) Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations in pancreatic acinar cells. *EMBO J* **13**(9): 2038-2043

Thorn P, Lawrie AM, Smith PM, Gallacher DV, Petersen OH (1993a) Ca<sup>2+</sup> oscillations in pancreatic acinar cells: spatiotemporal relationships and functional implications. *Cell Calcium* **14**(10): 746-757

Thorn P, Lawrie AM, Smith PM, Gallacher DV, Petersen OH (1993b) Local and global cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol trisphosphate. *Cell* **74**(4): 661-668

Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ (2003) The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* **4**(5): 404-409

Tinel H, Cancela JM, Mogami H, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Petersen OH (1999) Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca(2+) signals. *EMBO J* **18**(18): 4999-5008

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**: 145-149

Trichopoulou A, Katsouyanni K, Stuver S, Tzala L, Gnardellis C, Rimm E, Trichopoulos D (1995a) Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *J Natl Cancer Inst* **87**(2): 110-116

Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, Vassilakou T, Lipworth L, Trichopoulos D (1995b) Diet and overall survival in elderly people. *BMJ* **311**(7018): 1457-1460

Trichopoulou A, Lagiou P, Kuper H, Trichopoulos D (2000) Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**(9): 869-873

Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M (2005) The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev* **18**(1): 98-112

Tsujimoto Y, Shimizu S (2002) The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochimie* **84**(2-3): 187-193

Tsukamoto H (1998) Is interleukin-10 antifibrogenic in chronic liver injury? *Hepatology* **28**(6): 1707-1709

Tyrovoulas S, Panagiotakos DB (2010) The role of Mediterranean type of diet on the development of cancer and cardiovascular disease, in the elderly: a systematic review. *Maturitas* **65**(2): 122-130

Valentijn JA, Valentijn K, Pastore LM, Jamieson JD (2000) Actin coating of secretory granules during regulated exocytosis correlates with the release of rab3D. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1091-1095

- Valentijn K, Valentijn JA, Jamieson JD (1999a) Role of actin in regulated exocytosis and compensatory membrane retrieval: insights from an old acquaintance. *Biochem Biophys Res Commun* **266**(3): 652-661
- Valentijn KM, Gumkowski FD, Jamieson JD (1999b) The subapical actin cytoskeleton regulates secretion and membrane retrieval in pancreatic acinar cells. *J Cell Sci* **112** ( Pt 1): 81-96
- Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ (2001) Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**(6): G1197-1208
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* **52**(2): 269-324
- Vay Liang W LE, . DiMagno ER Gardner JD, Reber HA, Scheele GA (eds) (1993) The pancreas: biology and disease. *Raven Press, Ltd, New York* **1**: 7
- Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosio R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C (2005) Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr* **44**(2): 121-127
- Visioli F, Galli C (1994) Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci* **55**(24): 1965-1971
- Visioli F, Galli C (2002) Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr* **42**(3): 209-221
- Voisin T, Firar AE, Avondo V, Laburthe M (2006) Orexin-induced apoptosis: the key role of the seven-transmembrane domain orexin type 2 receptor. *Endocrinology* **147**(10): 4977-4984
- Wahle KW, Caruso D, Ochoa JJ, Quiles JL (2004) Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids* **39**(12): 1223-1231
- Wahle KW, Milne L, McIntosh G (1991) Regulation of polyunsaturated fatty acid metabolism in tissue phospholipids of obese (fa/fa) and lean (Fa/-) Zucker rats. 1. Effect of dietary lipids on cardiac tissue. *Lipids* **26**(1): 16-22
- Walker NI (1987) Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am J Pathol* **126**(3): 439-451
- Walsh JH (1987) *Gastrointestinal Hormones*, New York: Raven Press.
- Wang CC, Grossman MI (1951) Physiological determination of release of secretin and pancreaticozym from intestine of dogs with transplanted pancreas. *Am J Physiol* **164**(2): 527-545

Wang KK (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* **23**(1): 20-26

Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM (1995) Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* **270**(16): 9558-9563

Wang Q, Li MT, Qian JM, Lu CM, Lu H (2008) [Analysis of clinical features of autoimmune disease-related pancreatitis]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* **47**(12): 999-1002

Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**(22): 2922-2933

Wang ZF, Pan CE, Lu Y, Liu SG, Zhang GJ, Zhang XB (2003) The role of inflammatory mediators in severe acute pancreatitis and regulation of glucocorticoids. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **2**(3): 458-462

Wank SA (1998) G protein-coupled receptors in gastrointestinal physiology. I. CCK receptors: an exemplary family. *Am J Physiol* **274**(4 Pt 1): G607-613

Wank SA, Harkins R, Jensen RT, Shapira H, de Weerth A, Slattery T (1992) Purification, molecular cloning, and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7): 3125-3129

Ward JB, Sutton R, Jenkins SA, Petersen OH (1996) Progressive disruption of acinar cell calcium signaling is an early feature of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology* **111**(2): 481-491

Wasle B, Edwardson JM (2002) The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell. *Cell Signal* **14**(3): 191-197

Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**(16): 4406-4412

Weldon SM, Mullen AC, Loscher CE, Hurley LA, Roche HM (2007) Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *J Nutr Biochem* **18**(4): 250-258

White SH, von Heijne G (2004) The machinery of membrane protein assembly. *Curr Opin Struct Biol* **14**(4): 397-404

Willemer S, Elsasser HP, Adler G (1992) Hormone-induced pancreatitis. *Eur Surg Res* **24 Suppl 1**: 29-39

Willems PH, Van den Broek BA, Van Os CH, De Pont JJ (1989) Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release in permeabilized pancreatic acinar cells by hormonal and phorbol ester pretreatment. *J Biol Chem* **264**(17): 9762-9767

Williams JA (2001) Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol* **63**: 77-97

Williams JA, Blevins GT, Jr. (1993) Cholecystikinin and regulation of pancreatic acinar cell function. *Physiol Rev* **73**(4): 701-723

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

Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Mouri H, Sawabu N (2002) Induction of chemokines in rat pancreatic acinar cell injury. *Pancreas* **24**(2): 198-204

Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Plunket KD, Moore LB, Collins JL, Oplinger JA, Kliewer SA, Gampe RT, Jr., McKee DD, Moore JT, Willson TM (2001) Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13919-13924

Yagci G, Gul H, Simsek A, Buyukdogan V, Onguru O, Zeybek N, Aydin A, Balkan M, Yildiz O, Sen D (2004) Beneficial effects of N-acetylcysteine on sodium taurocholate-induced pancreatitis in rats. *J Gastroenterol* **39**(3): 268-276

Yago MD, Diaz RJ, Martinez MA, Audi N, Naranjo JA, Martinez-Victoria E, Manas M (2006) 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**(4): 242-249

Yago MD, Diaz RJ, Ramirez R, Martinez MA, Manas M, Martinez-Victoria E (2004) 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**(2): 227-234

Yago MD, Martinez-Victoria E, Huertas JR, Manas M (1997) Effects of the amount and type of dietary fat on exocrine pancreatic secretion in dogs after different periods of adaptation. *Arch Physiol Biochem* **105**(1): 78-85

Yago MD, Martinez MA, Audi N, Singh J, Mañas M, Martinez-Victoria E (2005) 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*: 206-207

Yamamoto Y, Gaynor RB (2004) IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* **29**(2): 72-79

Yamasaki M, Thomas JM, Churchill GC, Garnham C, Lewis AM, Cancela JM, Patel S, Galione A (2005) Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked Ca<sup>2+</sup> spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr Biol* **15**(9): 874-878

Yaqoob P (2009) The nutritional significance of lipid rafts. *Annu Rev Nutr* **29**: 257-282

Yi ZC, Liu YZ, Li HX, Wang Z (2009) Prooxidant action of chebulinic acid and tellimagrandin I: causing copper-dependent DNA strand breaks. *Toxicol In Vitro* **23**(3): 425-431

Ying B, Yang T, Song X, Hu X, Fan H, Lu X, Chen L, Cheng D, Wang T, Liu D, Xu D, Wei Y, Wen F (2009) Quercetin inhibits IL-1 beta-induced ICAM-1 expression in



pulmonary epithelial cell line A549 through the MAPK pathways. *Mol Biol Rep* **36**(7): 1825-1832

Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 47-59

Yu JH, Kim H, Kim KH (2003a) Calcium-dependent apoptotic gene expression in cerulein-treated AR42J cells. *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 66-69

Yu JH, Kim KH, Kim DG, Kim H (2007) Diphenyleiodonium suppresses apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Int J Biochem Cell Biol* **39**(11): 2063-2075

Yu JH, Kim KH, Kim H (2006) Suppression of IL-1beta expression by the Jak 2 inhibitor AG490 in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Biochem Pharmacol* **72**(11): 1555-1562

Yu JH, Lim JW, Kim H, Kim KH (2005a) NADPH oxidase mediates interleukin-6 expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Int J Biochem Cell Biol* **37**(7): 1458-1469

Yu JH, Lim JW, Kim KH, Morio T, Kim H (2005b) NADPH oxidase and apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar AR42J cells. *Free Radic Biol Med* **39**(5): 590-602

Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH (2002) Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. *Lab Invest* **82**(10): 1359-1368

Yu JH, Yun SY, Lim JW, Kim H, Kim KH (2003b) Proteome analysis of rat pancreatic acinar cells: implication for cerulein-induced acute pancreatitis. *Proteomics* **3**(12): 2446-2453

Yuan J, Horvitz HR (2004) A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell* **116**(2 Suppl): S53-56, 51 p following S59

Yuan J, Lugea A, Zheng L, Gukovsky I, Edderkaoui M, Rozengurt E, Pandol SJ (2008) Protein kinase D1 mediates NF-kappaB activation induced by cholecystokinin and cholinergic signaling in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**(6): G1190-1201

Yubero S, Ramudo L, Manso MA, De Dios I (2009) Mechanisms of dexamethasone-mediated chemokine down-regulation in mild and severe acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta* **1792**(12): 1205-1211

Yule DI, Williams JA (1994) *Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus*, 3 edn. New York: Raven Press.

Zabel-Langhennig A, Holler B, Engeland K, Mossner J (1999) Cyclooxygenase-2 transcription is stimulated and amylase secretion is inhibited in pancreatic acinar cells after induction of acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* **265**(2): 545-549

Zelander T, Ekholm R, Edlund Y (1962) The ultrastructural organization of the rat exocrine pancreas. III. Intralobular vessels and nerves. *J Ultrastruct Res* **7**: 84-101

Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* **9**(3): 625-636

Zhou A, Scoggin S, Gaynor RB, Williams NS (2003) Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* **22**(13): 2054-2064

Zhou H, Liu X, Liu L, Yang Z, Zhang S, Tang M, Tang Y, Dong Q, Hu R (2009) Oxidative stress and apoptosis of human brain microvascular endothelial cells induced by free fatty acids. *J Int Med Res* **37**(6): 1897-1903

# **S**UMMARY



## SUMMARY

A number of epidemiological studies have confirmed a low incidence of chronic diseases of oxidative-inflammatory aetiology, such as cardiovascular disease, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, and cancer, in populations living in the Mediterranean basin compared with those living in Northern European countries (Keys 1980; Trichopoulou 1999). These investigations show nutritional and health advantages of the Mediterranean food pattern over the Western one that have been attributed in part to the high content of monounsaturated fatty acids (MUFA), phenolic compounds (such as hydroxytyrosol) and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA). Their beneficial effects on oxidative and inflammatory conditions seem to be exerted through inhibition of cytokine gene expression and activity, and modification of intracellular signalling, among others (Wahle et al. 2004).

Without rejecting other possibilities, an important part of the anti-inflammatory effects of olive oil and dietary n-3 PUFA is due to the incorporation of dietary fatty acids to biological membranes and to the characteristics that this confers to the cell. Previous studies by our group have demonstrated an influence of dietary fat type on membrane composition of pancreatic acinar cells (Santana et al., 2009) and subsequent effects on cell function, both in vivo (Martinez et al., 2004; Yago et al., 2004) and in vitro (López-Millán et al., 2009).

It should be noted that, while the role of dietary fat (and, more recently, of many phytochemicals) has received much attention in relation to such conditions as atherosclerosis, rheumatoid arthritis or ulcerative colitis, very little is known about the potential role for these compounds in acute pancreatitis. A scarce number of articles published on this topic focused on assessing the therapeutic effectiveness of fatty acids/phytochemicals in subjects diagnosed with acute pancreatitis. However, no study has examined the influence of these dietary components from a preventive point of view, i.e., by the use of an experimental model in which the injury is induced *a posteriori*, after being pre-treated with them.

Among a variety of experimental models of acute pancreatitis we have chosen the caerulein hyperstimulation model, which is the most commonly used (both in vivo and in vitro) given that it induces biochemical, morphological and pathophysiological changes that closely resemble pancreatitis in humans. Our in vitro experimental model employs AR42J cells. This cell line, while sharing many characteristics of acinar cells, differ in several

aspects: i) They proliferate rapidly; ii) AR42J cells can synthesize, store and secrete digestive enzymes, but the regulation of exocrine function is abnormal; iii) they display neuroendocrine features. For these reasons, an important aspect of this PhD Thesis is the addition of dexamethasone to the culture medium in order to differentiate the cells towards an exocrine phenotype (Audi et al.,2007).

A first objective of this study is to validate a cell model of acute pancreatitis in differentiated AR42J cells. For this purpose, we have examined the inflammatory response and functional changes in cells hyperstimulated with caerulein. A second objective is to assess, in this model, the effect of pre-treatment with the phenolic compound hydroxytyrosol (HT). Last, we aimed to investigate whether enrichment of membrane fatty acids with either MUFA (oleic acid) or long chain n-3 PUFA (eicosapentaenoic acid - EPA plus docosahexaenoic acid - DHA), both in the absence or presence of HT, can influence inflammatory and functional parameters.

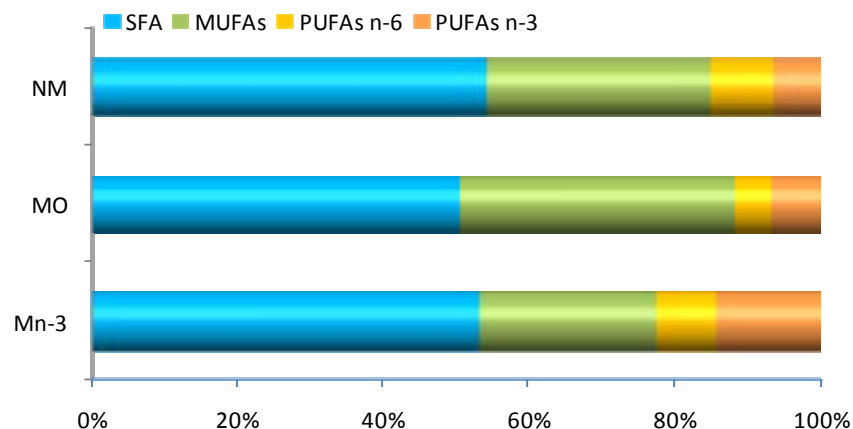
## Materials and Methods

Rat pancreatoma AR42J cell line, proceeding from the European Collection of Cell Cultures (ECACC N8: 93100618), was supplied by the Cell Bank of the Scientific Instrumentation Centre at the University of Granada (CIC-UGR, Granada, Spain). AR42J cells were used following treatment with 100 nM dexamethasone in culture medium for 72 hrs to induce differentiation. Membrane fatty acid modifications in AR42J cells were evoked during the 72-hr differentiation period by addition to culture medium of foetal calf serum (FCS) enriched in either oleic acid (C18:1 n-9, 50  $\mu$ M) or a mixture of EPA plus DHA (15  $\mu$ M EPA plus 10  $\mu$ M DHA), according to the method described by Audi et al. (2007). In this way, we obtained three groups of differentiated cells with a different membrane composition: not modified membranes (NM), membranes enriched with oleic acid (MO) and membranes enriched with n-3 PUFA (Mn-3). After this 72-h period, culture medium was changed and the respective treatments were applied for the next 26 h: (+/-) 50  $\mu$ M HT and/or (+/-)  $10^{-8}$  M caerulein (Ce; caerulein was added during the last 24 h to cells pretreated or not with HT). According to this design, for each membrane group (3) we had 4 treatment groups, resulting in a total of 12 experimental groups. Exceptionally,  $10^{-7}$  M caerulein (Ce) was used (in addition to  $10^{-8}$  M) in some cases to induce the cell model of pancreatitis. This will be indicated in the text by Ce-8 or Ce-7.

In order to confirm that cell membranes were enriched with the fatty acids added to the culture medium, analysis of membrane fatty acids was done by gas-liquid chromatography. The inflammatory response of AR42J cells was assessed by determination of i) NFκB activation. Cytosolic IκBα concentration was determined by Western blot (IκBα antibody purchased from Cell Signalling, 1:1000 dilution). Detection and quantification were performed using Odyssey Image Scanner System (Licor Biosciences, Cambridge, UK) using IRdye-conjugated secondary antibodies (Licor) and the Odyssey quantification software. In addition, after obtaining the nuclear and cytosolic fractions (*Nuclear Extract Kit, Active Motif*), we measured the nuclear levels of p65 with a commercial kit (*TransAM™ NFκB Chem p65/p50/p52, Active Motif*). ii) Secretion of cytokines. The concentration of IL-10, IL-6, IL-1β, and TNFα in conditioned medium was measured with a commercial kit based on the Luminex® xMAP® Technology (*MILLIPLEX™<sub>MAP</sub> RAT CYTOQUINE/CHEMOKINE 96 Well Plate Assay kit, Millipore*). To study the mechanisms of cell death, we examined apoptosis and necrosis by flow cytometry of cells stained with the *ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT* (Immunostep). Cell viability was estimated by the MTT assay. Cell function of AR42J cells after the different treatments was evaluated by measuring changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration evoked by 10<sup>-9</sup> M CCK-8 in FURA-2-loaded cells, and amylase secretion in response to graded concentrations (10<sup>-11</sup>-10<sup>-7</sup> M) of CCK-8.

## Results and Discussion

Analysis of membrane fatty acids revealed that membranes enriched with those fatty acids added to the culture medium, which in turn, affected other fatty acid fractions (Figure 1). Compared with NM cells (not modified), enrichment with MUFA in MO cells was done at the expense of both saturated fatty acids (SFA) and n-6 PUFA. Compared with NM cells, enrichment with n-3 PUFA in Mn-3 cells was done mainly at the expense of MUFA. Among the three groups, MO cell membranes had the highest level of MUFA, and those of Mn-3 cells had the highest level of n-3 PUFA.



**Figure 1.** Fatty acid profile of crude membranes from differentiated (100 nM dexamethasone) AR42J cells cultured for 72 hrs in medium containing unmodified serum (NM), serum enriched in 18:1 n-9 (MO) or serum enriched in n-3 PUFA (EPA plus DHA, Mn-3). Values are percentages of total fatty acid content (mean). SFA, saturated fatty acids; MUFAs, monounsaturated fatty acids; PUFAs n-6, n-6 polyunsaturated fatty acids; PUFAs n-3, n-3 polyunsaturated fatty acids.

## ***Cell model of acute pancreatitis in differentiated AR42J cells with not modified membranes (NM)***

### *Inflammatory response*

Caerulein induced NF- $\kappa$ B activation within 30 min, which was confirmed by a significant ( $p < .05$ ) reduction in the cytosolic concentration of I $\kappa$ B $\alpha$  together with a significant increase ( $p < .05$ ) of p65 nuclear levels. These results are in good agreement with those obtained in experiments conducted in the whole animal preparation, in isolated pancreatic acinar cells and in not differentiated AR42J cells (Han et al., 2000; Chan et al., 2011; Yu et al., 2002). In our study, NF- $\kappa$ B activation is followed (at 24 h post caerulein) by a greater ( $p < .05$ ) secretion of IL-6. However, this response triggered by caerulein is not seen in the presence of HT. This effect is likely due to the antioxidant effect of this phenol, which may be scavenging reactive oxygen species (ROS) produced by caerulein treatment. Indeed, NF- $\kappa$ B has been shown to be redox-sensitive in not differentiated AR42J cells (Yu et al., 2002).



### *Apoptosis/Necrosis*

Caerulein treatment for 24 h, both at  $10^{-8}$  M and  $10^{-7}$  M, decreased the percentage of live cells, mainly causing apoptotic death. However, this is avoided in the presence of HT.

### *MTT*

AR42J cells treated with caerulein  $10^{-8}$  and  $10^{-7}$  M showed a lower viability as measured by this method (indicative of mitochondrial capacity to reduce MTT to formazan). This may be related with the caerulein-induced increase in apoptosis. Caerulein cytotoxic effect on these cells could be, at least in part, exerted at a mitochondrial level, through cytochrome c release and activation of the apoptotic cascade.

### *Cell function*

Caerulein disturbed the physiological pattern of response to CCK-8, both in terms of  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and amylase secretion. The alterations were much less evident when caerulein was added in the presence of HT.

At the light of our results, our cell model of caerulein-induced acute pancreatitis seems to be valid for our purposes, since the events that culminate in pancreatitis are similar to those described by other authors, not only in vivo (whole animal preparation) and ex vivo (acinar cells prepared from pancreatic rats) but also in AR42J cells, with the particularity that our work has been done in differentiated AR42J cells that behave very similar to rat acinar cells, not in de-differentiated proliferating cancerous cells, as most studies.

## ***Influence of AR42J membrane enrichment with oleic acid (MO)***

### *Inflammatory response*

In contrast to not modified (NM) cells, caerulein did not induce an inflammatory response in MO cells. There were no differences in NF- $\kappa$ B activation or in cytokine secretion between cells not treated (MO) or treated with caerulein (CeMO), suggesting some anti-

inflammatory protection by this fatty acid membrane profile against the damaging effects of caerulein exposure. A lower proportion of PUFA, and subsequent lower susceptibility to oxidation and generation of lipid peroxides, may be underlying the abolition of NF- $\kappa$ B.

### *Apoptosis/Necrosis*

Caerulein (both at  $10^{-8}$  M and  $10^{-7}$  M) did not modify the percentage of live cells compared with not treated MO cells. Within the remaining population (apoptotic/necrotic), the proportion of apoptotic cells increased slightly after  $10^{-7}$  M caerulein treatment compared with untreated MO cells. Thus, differentiated AR42J cells whose membranes were enriched with oleic acid showed a great stability against caerulein injury.

### *MTT*

Only at the high concentration of  $10^{-7}$  M caerulein was able to reduce cell viability compared with not treated cells (MO), an effect that can possibly be related with the slight increase in apoptotic death found in these conditions.

### *Cell function*

Similar to untreated MO cells, MO cells treated for 24 h with caerulein showed altered cell function as measured by  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and amylase secretion in response to CCK-8.

To summarise, enrichment of cell membranes with oleic acid may be protecting AR42J pancreatic cells against the early events that, while being initiated within the cell, typically lead to amplification of the inflammatory burst associated to acute pancreatitis. However, similar to not modified cells (i.e. cell cultured in standard culture medium), caerulein disrupts the normal response to pancreatic secretagogues such as CCK-8. Hydroxytyrosol (HT) had in MO cells an ambiguous effect, which, according to other authors (Gill et al., 2005; Perona et al., 2006) can be due to its ability to act either as pro-oxidant or anti-oxidant, depending on the cell damage status.

## ***Influence of AR42J membrane enrichment with n-3 PUFA (Mn-3)***

### *Inflammatory response*

No significant differences in NFkB activation or pro-inflammatory cytokine secretion were found in Mn-3 cells treated or not with caerulein. This anti-inflammatory effect of n-3 PUFA has been widely reported in other cell types (Draper et al., 2010) and constitutes one of the hallmarks of the beneficial effects of the Mediterranean food pattern.

### *Apoptosis/Necrosis.*

Only caerulein at a concentration of  $10^{-7}$  M was able to reduce the percentage of live cells at the same time that increased the percentage of apoptotic cells. This effect was not apparent when caerulein was added in the presence of 50  $\mu$ M HT.

### *MTT*

Both concentrations of caerulein ( $10^{-8}$  and  $10^{-7}$  M) produced a cytotoxic effect, which did not occur in the presence of HT.

### *Cell function*

Cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in response to CCK-8 was markedly reduced in cells previously treated with caerulein for 24 h compared with untreated Mn-3 cells. As for CCK-8-stimulated amylase secretion, this was already reduced by the mere enrichment of membranes with n-3 PUFA (interestingly, the secretory rates of Mn-3 cells returned to normal values observed in NM cells after HT pretreatment). Caerulein treatment of Mn-3 cells did not reduce further amylase secretion.

It can be concluded that both AR42J cells with membranes enriched in oleic acid and in n-3 PUFA were more resistant to inflammatory damage induced by caerulein, probably through different mechanisms. These two membrane fatty acid profiles were not associated with a preserved cell function after a 24h treatment with caerulein, although a difference is noted between both cell groups in that enrichment with n-3 PUFA *per se* reduces CCK-8

stimulated amylase secretion, an effect that is not produced in the presence of HT. Our results suggest that a high PUFA content in the membrane exerts a negative effect on AR42J cell function. This may be related with a high unsaturation index and a greater susceptibility to lipidic oxidation, which could involve some degree of oxidative damage at baseline. This is confirmed by the fact that normal secretory rates are achieved in Mn-3 cells pretreated with HT.

## References

- Audi, N., Mesa, M.D., Martinez, M.A., Martinez-Victoria, E., Manas, M., and Yago, M.D. (2007). Membrane lipid composition of pancreatic AR42J cells: modification by exposure to different fatty acids. *Exp Biol Med* (Maywood) 232, 532-541.
- Chan YC, Leung PS. Co-operative effects of angiotensin II and caerulein in NF $\kappa$ B activation in pancreatic acinar cells in vitro. *Regul Pept.* 2011 Jan 17;166(1-3):128-34. Epub 2010 Oct 17
- Draper E, Reynolds CM, Canavan M, Mills KH, Loscher CE, Roche HM. Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF- $\kappa$ B independent of PPAR $\gamma$  *J Nutr Biochem.* 2010 Nov 25. [Epub ahead of print]
- Gill CI, Boyd A, McDermott E, McCann M, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro G, McGlynn H, Rowland I. Potential anti-cancer effects of virgin olive oil phenols on colorectal carcinogenesis models in vitro. *Int J Cancer.* 2005 Oct 20;117(1):1-7.
- Han B, Logsdon CD. CCK stimulates mob-1 expression and NF-kappaB activation via protein kinase C and intracellular Ca(2+). *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Feb;278(2):C344-51.
- Keys, A. (1980). *Seven Countries: A multivariate analysis of diet and coronary heart disease.* Cambridge: Harvard University Press.
- López-Millán, M.B., Santana, C., Audi, N., Martínez-Burgos, M.A., Mesa, M.D., Martínez-Victoria, E., Mañas, M., and Yago, M.D. (2009). Modification of membrane fatty acid composition of pancreatic AR42J cells influences bile acid-induced ca<sup>2+</sup> responses. In XXXV Congreso de la SECF (XXXV Congreso de la SECF), pp. 154-155.
- 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.* 2004 Jun;20(6):536-41.
- Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem.* 2006 Jul;17(7):429-45. Epub 2005 Dec 12.
- Santana, C.V., López, M.B., Mañas, M., and Yago, M.D. (2009). Influence of dietary lipid composition on the pancreatic lipid profile. In *AgroFOOD industry hi-tech (AgroFOOD industry hi-tech)*, pp. 48-51.
- Trichopoulou, A. (1999). Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to other populations? A cohort study in Melbourne, Australia. *Br J Nutr* 82, 57-61.
- Wahle, K.W., Caruso, D., Ochoa, J.J., and Quiles, J.L. (2004). Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids* 39, 1223-1231.
- 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.* 2004 Feb;91(2):227-34.
- Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. *Lab Invest.* 2002 Oct;82(10):1359-68.

Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. *Lab Invest.* 2002 Oct;82(10):1359-68.

# **C**ONCLUSIONS





## CONCLUSIONS

1. A model of caerulein-induced acute pancreatitis in AR42J cells differentiated with dexamethasone towards an exocrine phenotype is described in this PhD thesis for the first time. Differentiation of AR42J cells with dexamethasone leads to a closer phenotype to rat pancreatic acinar cells. This methodological approach makes some of our results discordant with those reported by other authors employing undifferentiated amphycrine AR42J cells.

2. We describe a method for modifying the lipid membrane profile of AR42J cells where enrichment in specific fatty acids was induced by supplementing the culture medium with them. Fatty acid compositional modifications in AR42J cell membranes were similar to those evoked in rat pancreatic acinar cells when habitual dietary fat type is altered. Thus, this model allows to study the functional repercussions of this modification.

3. In our model, caerulein ( $10^{-8}$  M and/or  $10^{-7}$  M)

- a) Triggers an inflammatory response evidenced by activation of nuclear factor kappa B (NFkB) as determined by levels of I $\kappa$ B $\alpha$  in cytosol and p65 in nucleus. This inflammatory response is further confirmed by increased and decreased secretion of IL-6 and IL-10, respectively, leading to a lower IL-10/IL-6 ratio, a biomarker which is inversely related with the severity of the pancreatic inflammatory response.
- b) Increases apoptotic cell death and, proportionally, decreases necrosis. Cell viability as assessed by MTT assay was reduced by caerulein.
- c) Modifies cell function as follows: 1) the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> response to CCK-8 is markedly deranged, with the initial Ca<sup>2+</sup> rise being mainly affected; 2) Net amylase secretion evoked by CCK-8 was also significantly diminished as compared with cells not treated previously with caerulein.

As a whole, our model shows a clear cell damage that resembles the early events reported in other models of acute pancreatitis, both in vivo and in vitro by the use of undifferentiated AR42J cells, in relation to inflammatory parameters, cell death pattern, and secretagogue-stimulated Ca<sup>2+</sup> signalling and amylase secretion.

4. Describing the role of hydroxytyrosol, a phenolic compound present in significant amounts in the unsaponifiable fraction of virgin olive oil, in AR42J cells with unmodified or modified membranes, and treated or not with caerulein, would be extensive. Thus, this conclusion summarizes the general lines of hydroxytyrosol actions according to the results of our study. Considering our experimental model and the above-mentioned situations, hydroxytyrosol seems to have pleiotropic effects, behaving as a pro-oxidant, anti-oxidant or a neutral compound as a function of the experimental setting. In general terms, hydroxytyrosol acts as an antioxidant when polyunsaturation of cell membranes increases or when the cells evidence cell damage associated with oxidative stress. In other circumstances, such as the presence of less polyunsaturated membranes or undamaged cells, hydroxytyrosol either acts as a pro-oxidant or has no effect. It is important to note that this phenolic compound was able to potentiate greatly CCK-8-stimulated amylase secretion in all experimental groups.

5. The modification of membrane fatty acid profile resulting by the addition of either oleic acid or a mixture of EPA plus DHA to the culture medium evokes in AR42J cells changes in the inflammatory response, cell viability and death, and cell function estimated by secretagogue-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and amylase secretion. These changes are apparent both in cells treated or untreated with caerulein:

- a. In healthy cells, not treated with caerulein, fatty acid changes affect mainly the contribution of cell death mechanisms and amylase secretion.
- b. In cells injured by caerulein, the previous modification of membrane fatty acid composition results in the abolishment of the inflammatory response; cell death mechanisms are less affected or, alternatively, the apoptosis-necrosis balance is altered; and cell function remains deranged.

6. Comparatively, enrichment of AR42J cell membranes in either monounsaturated fatty acids (MUFA) or long-chain polyunsaturated fatty acids (long-chain PUFA) is associated with different cell responses:

- a) In both groups of cells, caerulein-induced inflammation is reduced as compared with cells with unmodified membranes, although the underlying mechanisms appear to be different.

- b) Membrane enrichment in PUFA increases apoptosis whereas cells whose membranes are enriched in MUFA are less sensitive to caerulein in terms of cell death.
- c) CCK-8-stimulated amylase secretion is markedly disturbed in AR42J cells whose membranes are enriched in n-3 PUFA, especially after caerulein treatment.

## GENERAL CONCLUSION

In the study included in this PhD thesis we had two aims. A first one was to develop an *in vitro* experimental model that would allow us to investigate the influence that modification of membrane fatty acid profile as induced by dietary means has upon pancreatic cell response to an inflammatory-oxidative insult by caerulein (acute pancreatitis). A second objective was the role of different constituents of the Mediterranean diet in the prevention or attenuation of cell damage. We have chosen oleic acid and long-chain n-3 PUFA, abundant in olive oil and fish oil, respectively, to achieve membrane modification, and hydroxytyrosol as representative of the abundance of antioxidants in the Mediterranean diet in order to study its actions *per se* and in conjunction with membrane modification.

The results of our study confirm that we have developed a valid *in vitro* model of caerulein-induced acute pancreatitis in AR42J cells differentiated to a phenotype closer to pancreatic acinar cells than those models based on undifferentiated cells. In addition, our model permits the modification of membrane fatty acid composition.

Concerning the effects of those ingredients typical of the Mediterranean diet, if we consider our overall results, we believe that modification of membrane fatty acid composition evidences some positive aspects of the cell reaction against caerulein in terms of inflammatory response and cell death pattern. However, more studies are needed in order to elucidate the role of Mediterranean components in the management of cell damage. Among others, the following aspects should be considered:

- It may be convenient to modify pancreatic membranes with a mixture of fatty acids that reproduces the overall pattern of the Mediterranean diet.

- It is important to make clear the previous status of the organism or cell and to establish the optimum doses/concentrations for the antioxidants to exert a beneficial effect.
- The determination of how cell damage is influenced by membrane modification may be considerable.

The results presented in this PhD thesis constitute, in our opinion, a step forward in the development of a valid experimental model to ascertain the relevance that dietary-induced modification of membrane fatty acid composition has in determining the cell response to noxious stimuli. This would help us to know the mechanisms by which a healthy diet, such as the Mediterranean one, can reduce our susceptibility to suffer a great number of frequent conditions.



**A**NEXO

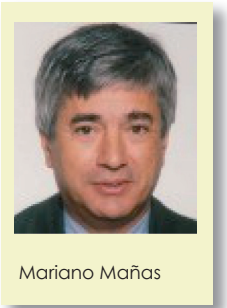


# Influence of dietary lipid composition on the pancreatic lipid profile

CAROLA V. SANTANA, MARÍA B. LÓPEZ, MARIA A. MARTÍNEZ-BURGOS, MARIANO MAÑAS\*, MARÍA D. YAGO

\*Corresponding author

University of Granada, Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology "J. Mataix" Centre for Biomedical Research at the Health Science Technology Park, Armilla (Granada), 18100, Spain



Mariano Mañas

**ABSTRACT:** The biological effects of dietary fatty acids are the result of their incorporation into the cellular structures of the different organs and tissues. The pancreatic tissue is very responsive to dietary fat changes. The type of dietary fat modulates not only the membrane fatty acid composition of the rat pancreas but also the exocrine function. This review article highlights our findings on the influence of dietary lipids upon the lipid profile of pancreatic membranes, and the subsequent changes in secretagogue-evoked secretory activity and intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization. Our observations may be relevant at present, when the role of dietary lipids in human health and quality of life is being actively debated.

**KEYWORDS:** pancreatic acini, AR42J, lipid profile, fatty acids, Mediterranean diet.

## INTRODUCTION

The involvement of diet in human health and in the prevention and treatment of disease is a well-known topic, recognized and accepted by international organisms and institutions for a long time. The Mediterranean diet (which contains up to 40 percent of calories as fat) is characterized by a high intake of olive oil, in close association with low rates of chronic diseases among the population. Nowadays there is substantial evidence supporting the notion that olive oil exhibits numerous biological functions which are beneficial for the state of health. As an example, it appears to have important roles in preventing cardiovascular disorders. In fact, it is known that Mediterranean countries have a lower prevalence of cardiovascular diseases compared to Northern Europe and other developed countries, and life expectancies that are among the highest (1). Olive oil not only benefits the cardiovascular system, but also seems to offer considerable protection against cancer, inflammatory diseases and other illnesses whose etiology is mediated by an unbalanced free radical production in specific tissues and organs and disturbances in the intracellular concentration of calcium ion (Ca<sup>2+</sup>).

Habitual consumption of dietary fats with varying degrees of unsaturation appears to have different physiological consequences and effects on health. It is generally accepted that biological membranes do not have a constant composition. Some factors, such as the type of dietary fat, can modulate the structure and function of cell membranes (2). Dietary fat can modify membrane fatty acid composition in a variety of mammalian cells. The changes can be of sufficient magnitude as to affect a number of cellular functions, including carrier-mediated transport, transduction pathways, activity of membrane-bound enzymes, receptor binding and exocytosis processes (3, 4). Many of these functional responses are likely caused directly by the structural changes in membrane lipids, 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.

Many authors have investigated the adaptation of human

and animal cells to dietary fat type, and the results indicate that the different tissues respond in tissue-specific ways (5). This adaptation involves a modification of membrane lipid profile as well as changes in membrane fluidity and cell function, particularly the transport capacity and metabolic activity of membranes (6). Dietary fat-induced changes in membrane lipid composition are not the same in all tissues, some of them responding better than others. The liver, for instance, is very sensitive to dietary-induced changes (7). In contrast, other tissues or organs such as the brain (8) and the skeletal muscle (7), show relatively minor adaptive alterations in the lipid composition of their membranes.

At the Institute of Nutrition in the University of Granada, our research group has been working on dietary fat and gastrointestinal system since 1980, and particularly on how the composition of habitual dietary fat affects the membrane fatty acid profile of pancreatic acinar cells, which in turn influences cell function and signalling. Our general objective is to understand the biological role of a typical component of the Mediterranean diet (oleic acid) in the cellular mechanisms underlying the development of oxidative-inflammatory diseases like acute pancreatitis in order to provide scientific demonstration of a possible effect, as functional ingredient, in the prevention and/or attenuation of the severity of this pathologic process.

## STUDIES IN RAT PANCREATIC ACINI

The mechanisms of pancreatic adaptation to the type of dietary fat are unclear. According to our data, a possibility is that dietary fat composition can change the responsiveness of the exocrine pancreas to circulating secretagogues through modification of the membrane fatty composition of pancreatic acinar cells. It has been demonstrated in different tissues that the lipid profile of the diet can influence the fatty acid composition of cell membranes, evoking a modification of cell function. Regarding the exocrine pancreas, information on this topic is very limited. For this reason we decided to compare the effects of virgin olive oil, a typical component of the Mediterranean diet and a good source of monounsaturated fatty acids (MUFA), with those of sunflower oil, which is rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA). Both oils compete in Southern European markets for consumers' preference.

As a result of these studies, we confirmed (9) that the rat pancreas is very sensitive to dietary fat changes. The rats



were fed over an 8 week period with one of two semi purified, isoenergetic and isonitrogenous diets that differed only in the nature of the fat source: virgin olive oil or sunflower oil. After 8 weeks on the diets, pancreatic membranes in the olive oil group had significantly higher levels of 18:1 n-9 (oleic acid) and total MUFA, whereas a higher level of PUFA, particularly n-6 PUFA such as 18:2 n-6 (linoleic acid) and 20:4 n-6 (arachidonic acid), was found in the sunflower oil group. In this study, the proportion of total saturated fatty acids (SFA) was similar in the membranes of the two groups (Table 1). This resistance of the SFA fraction to dietary-induced alterations is a common feature in different tissues, as reported by other authors (10, 11).

The main function of pancreatic acinar cells is to synthesize, store and, then, undergo regulated secretion of digestive enzymes. Cholecystokinin (CCK) is a major hormonal regulator of the rat pancreatic acinar function, while also playing a role in the regulation of pancreas growth. The pancreatic secretagogue CCK-8 activates, by a G protein-dependent mechanism, the plasma membrane phospholipase C, which generates inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG). IP3 is related with the release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular pools, thereby initiating the Ca<sup>2+</sup> signal. Ca<sup>2+</sup> is an ubiquitous second messenger involved in many physiologic functions such as muscle contraction, metabolism, secretion, and even cell differentiation and apoptosis. In pancreatic acinar cells, Ca<sup>2+</sup> is a key mediator of CCK-8-stimulated enzyme secretion.

It has been accepted for many years that the exocrine function of the pancreas is influenced by the type of dietary fat. The approach most frequently used to investigate this topic has been the analysis of the enzyme content of the pancreas after feeding animals different dietary lipids (12, 13). Our research aimed to take a step further by investigating whether adaptation of pancreatic membranes to dietary lipids was associated with changes in the secretory activity of viable rat pancreatic acinar cells stimulated with pancreatic secretagogues. It is well known that the concentration-response curve for CCK-8-induced amylase secretion in suspensions of pancreatic acinar cells is bell-shaped, reaching a maximum at around 0.1 nM (14). Consistent with this, our results in viable acini isolated from rats fed for 8 weeks on diets containing either virgin olive oil or sunflower oil as the source of dietary fat (9) showed the strongest secretory effect at 0.1 nM CCK-8, with a typical decrease occurring after the addition of higher concentrations of the secretagogue. This pattern was followed in cells from both groups. However, comparison between them revealed the existence of marked quantitative differences. Thus, at any particular concentration of CCK-8, the sunflower oil diet was associated with a significant reduction in net amylase secretion compared with the olive oil diet (9).

The diminished secretory activity after sunflower oil feeding may be explained, without excluding other components of the secretory pathway, by attenuation of CCK-8-evoked Ca<sup>2+</sup> responses in this group (9). Moreover, the fact that not only the absolute value of the Ca<sup>2+</sup> peak but also the peak increase over basal was lower in cells from the sunflower oil-

Fatty acid	Olive oil group	Sunflower oil group
18:0	6.69 ± 0.62 **	10.25 ± 0.86
18:1 n-9	42.86 ± 1.99 ***	25.37 ± 1.11
18:2 n-6	4.45 ± 0.60 ***	17.88 ± 1.32
18:3 n-3	0.39 ± 0.04	0.31 ± 0.08
20:4 n-6	5.54 ± 0.70 *	9.83 ± 1.34
20:5 n-3	0.629 ± 0.061	0.455 ± 0.134
22:6 n-3	0.580 ± 0.090	0.913 ± 0.215
SFA	39.71 ± 2.33	40.34 ± 2.02
MUFA	48.11 ± 2.29 ***	29.72 ± 1.41
PUFA	12.17 ± 1.41 ***	29.94 ± 2.25
n-6 PUFA	10.50 ± 1.28 ***	28.15 ± 2.18
n-3 PUFA	1.67 ± 0.14	1.80 ± 0.24

Table 1. Fatty acid profile of rat pancreatic cell membranes after the 8-week adaptation period to the experimental diets. Values are percentages of total fatty acid content (mean ± standard error). Compared with the sunflower oil group: \* P < 0.05; \*\* P < 0.005; \*\*\* P < 0.001 (n = 12 for both groups).

fed rats suggests a reduction in the filling state of CCK-8 releasable Ca<sup>2+</sup> pools and/or a limitation in the production or effectiveness of the mediators that participate in the Ca<sup>2+</sup> mobilization pathways.

Ca<sup>2+</sup> signals in response to physiologic concentrations of CCK-8 consist of repetitive cytosolic Ca<sup>2+</sup> spikes generated by release of Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum in the apical pole. Our first Ca<sup>2+</sup> measurements (9, 15) were done in acinar cell suspensions by means of a fluorimeter, where Ca<sup>2+</sup> oscillations cannot be resolved. Then, we decided to study cellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in single cells by using an inverted fluorescence microscope attached to a continuous perfusion system. In this occasion we used rats fed either our olive oil diet or a commercial chow for this species (16).

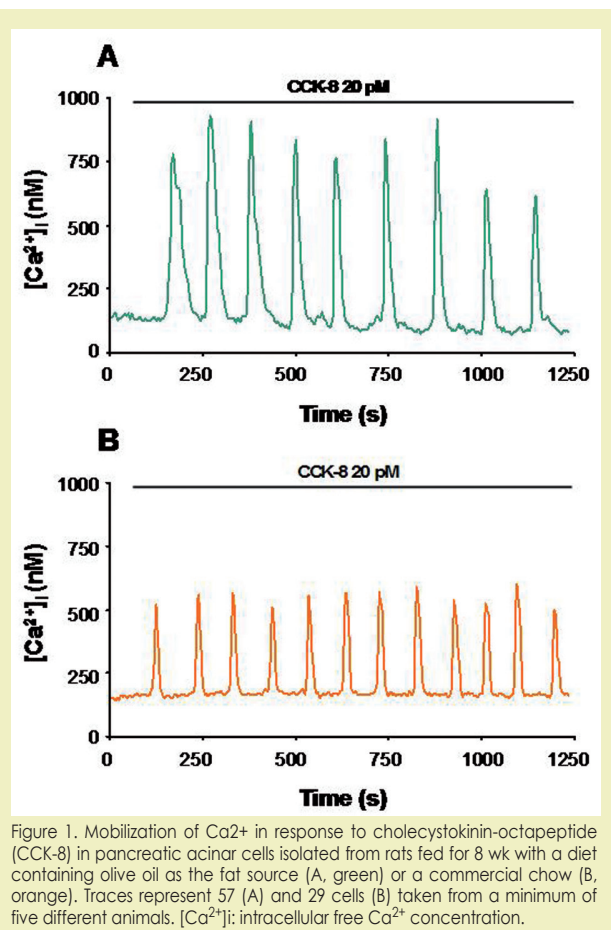


Figure 1. Mobilization of Ca<sup>2+</sup> in response to cholecystokinin-octapeptide (CCK-8) in pancreatic acinar cells isolated from rats fed for 8 wk with a diet containing olive oil as the fat source (A, green) or a commercial chow (B, orange). Traces represent 57 (A) and 29 cells (B) taken from a minimum of five different animals. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration.

The data showed that the amplitude of Ca<sup>2+</sup> oscillations in response to physiologic concentrations of CCK-8 (20 pM) was significantly increased by the olive diet compared to the chow diet (Figure 1). Large Ca<sup>2+</sup> transients in response to relatively high concentrations of CCK-8 (10 nM) and, also, to the secretagogue acetylcholine (ACh, 10 μM), were enhanced by olive oil feeding as well. In addition, we found that these effects of virgin olive oil on Ca<sup>2+</sup> mobilization correlated, to a great extent, to secretagogue-induced amylase secretion (Figure 2). The differences in acinar secretory activity and Ca<sup>2+</sup> mobilization are most probably related to the dietary-induced changes in cell membrane composition.

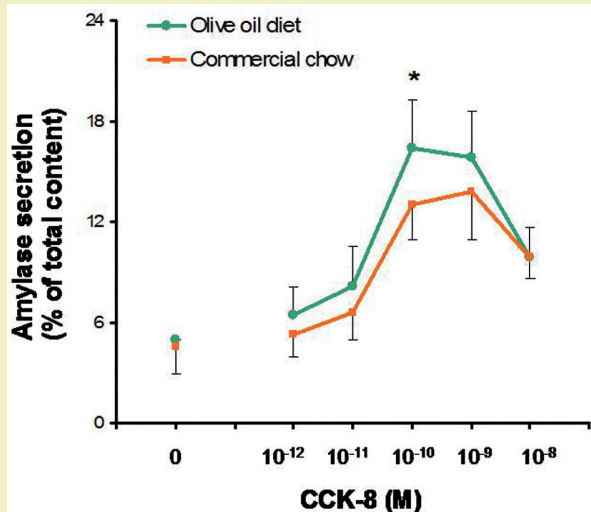


Figure 2. Concentration-response curve for CCK-8-induced amylase secretion in pancreatic acinar cells isolated from rats fed for 8 wk with a diet containing olive oil as the fat source or a commercial chow. Acini were incubated in the presence or absence of the secretagogue for 30 min at 37°C. Results show the mean  $\pm$  standard error ( $n=6-12$ ). \*  $P < 0.05$  between the groups. CCK-8: cholecystokinin-octapeptide.

Many steps of the stimulus-secretion coupling process are membrane-dependent. Differential enrichment in certain fatty acids may influence the accessibility of secretagogue receptors, the interaction with G proteins, or the functionality of such enzymes as phospholipases and protein kinase C, which interact with cell membranes during their activation. In the exocrine pancreas, the existence of CCK and ACh receptors is well established, and they are linked to phospholipase C. The membrane modifications could involve an alteration in phosphoinositide turnover and a change in the supply of inositol lipid precursors of IP<sub>3</sub>. Increased IP<sub>3</sub> production in acini from rats fed with olive oil may explain enhanced intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization in response to CCK-8 and ACh, because the initial increase in large Ca<sup>2+</sup> transients is mainly due to Ca<sup>2+</sup> released from IP<sub>3</sub>-sensitive internal stores. It is also tempting to speculate that DAG, abundantly generated by phospholipase C and, possibly, with different acyl moieties as a consequence of dietary-induced membrane changes, may have resulted in our study in differential activation of protein kinase C, a crucial modulator of the secretory machinery of acinar cells.

#### STUDIES IN AR42J CELL LINE

The lipid components of biological membranes are important for normal cell function, and their improper distribution or metabolism can have serious consequences for cells and organisms. Changes in the organization of lipids can have profound effects on cellular functions (17). Plasma membrane lipids not only serve as an inert support for membrane proteins but also play an active role in cell activity that has yet to be fully understood. For this reason, research in nutritional science is trying to elucidate the effect of dietary lipids on membrane composition and cell function. 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, the environmental conditions can be controlled better and the adaptation of membranes to dietary fat is achieved in few days (18).

The AR42J acinar cell line is derived from a transplantable tumour of the rat exocrine pancreas (19). It 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. In addition, AR42J

cells show receptor expression and signal transduction mechanisms parallel to those of normal pancreatic acinar cells (20) and has been widely used as an *in vitro* model to study secretory activity, cytoskeleton function, cell signalling, apoptosis and pancreatitis responses of the exocrine pancreas (21-23). Thus, we hypothesized that this cell line could be a suitable cell model for our purpose of examining the molecular mechanisms of the effect of dietary lipids on membrane composition and cell function. A first step 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 (9, 15, 16). In this study (18), membrane fatty acid modifications in AR42J

cells were evoked by adding fetal calf serum supplemented with 18:1 n-9 (AR42J-O) or 18:2 n-6 (AR42J-L), the two major components of olive oil and sunflower oil, respectively, to the culture medium during the 72 hr differentiation period. Final concentration of added fatty acids in medium was 50 mM. Control cells (AR42J-C) were fed the culture medium containing the intact, unmodified serum.

The results indicate that this strategy profoundly influenced the fatty acid composition of AR42J crude membranes (18). More specifically, membranes became enriched in the particular fatty acid added to the medium 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. Both virgin olive oil in rat pancreas and 18:1 n-9 in cells induced 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 (Table 2). Variations in the other fatty acid indices, including the SFA/MUFA ratio, followed the same trend after feeding oils *in vivo* or growing the cells in culture in the presence of enhanced

Fatty acid	AR42J-C	AR42J-O	AR42J-L
18:0	16.41 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	12.35 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	13.04 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>
18:1 n-9	25.69 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	32.40 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>	15.95 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>
18:2 n-6	3.33 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	2.39 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	17.03 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
18:3 n-3	3.83 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	5.11 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	3.78 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
20:4 n-6	3.80 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.01 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	1.86 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
20:5 n-3	0.58 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.39 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
22:6 n-3	1.87 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.08 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.88 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
SFA	54.55 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	50.84 $\pm$ 0.75 <sup>b</sup>	52.41 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>
MUFA	30.47 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	37.51 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>	20.9 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>
PUFA	14.89 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	11.6 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	26.69 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>

Table 2. Selected fatty acids in membranes from differentiated AR42J cells cultured for 72 hr 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). Values are percentages of total fatty acid content (mean  $\pm$  standard error). AR42J-C:  $n = 18$  (from 6 batches of cells); AR42J-O:  $n = 15$  (from 5 batches); AR42J-L:  $n = 15$  (from 5 batches). By row, values with different superscript letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

concentrations of the respective major fatty acid. Next, we investigated whether the above changes in the lipid profile of AR42J membranes caused a similar modulatory effect on the secretory activity (unpublished data). Our results showed that net amylase secretion stimulated by different concentrations of CCK-8 was lower in AR42J-L than in AR42J-O, similar to our findings in rat pancreatic acinar cells from rats fed with sunflower or olive oil diets (9). In conclusion, the results of these investigations carried out by our group demonstrate that the type of dietary fat modulates not only the membrane fatty acid composition of pancreatic acinar cells but also their functional properties, in terms of secretory activity and signal transduction pathways evoked by secretagogues like CCK-8. The relevance of these facts is underlined by the notion that alterations in cell membranes in response to dietary fat might have health consequences and affect the quality of life. In addition, 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.

## REFERENCES AND NOTES

1. M. Nestle, "Mediterranean diets: historical and research overview", *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**, pp. 1313S-1320S (1995).
2. M.T. Clandinin, C.J. Field et al., "Role of diet fat in subcellular structure and function", *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **63**, pp. 546-556 (1985).
3. J.L. Quiles, J.R. Huertas et al., "Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissues in the rat", *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, pp. 127-34 (2001).
4. R.S. Chapkin, M.Y. Hong et al., "Dietary n-3 PUFA alter colonocyte mitochondrial membrane composition and function", *Lipids*, **37**, pp. 193-199 (2002).
5. E. Berlin, S.J. Bhatnaga et al., "Dietary menhaden and corn oils and red blood cell membrane lipid composition and fluidity in hyper- and normocholesterolemic miniature swine", *J. Nutr.*, **128**, pp. 1421-1428 (1998).
6. M.T. Clandinin, C.J. Field et al., "Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function", *FASEB J.*, **5**, pp. 2761-2769 (1991).
7. J.L. Quiles, J.R. Huertas et al., "Physical exercise affects the lipid profile of mitochondrial membranes in rats fed with virgin olive oil or sunflower oil", *Br. J. Nutr.*, **81**, pp. 21-24 (1999).
8. L. Abedin, E.L. Lien et al., "The effects of dietary alpha-linolenic acid compared with docosahexaenoic acid on brain, retina, liver, and heart in the guinea pig", *Lipids*, **34**, pp. 475-482 (1999).
9. M.D. Yago, R.J. Díaz et al., "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**, pp. 227-234 (2004).
10. M.E. Begin, G. Ells et al., "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**, pp. 151-160 (1990).
11. F.J. Soriguer, F.J. Tinahones et al., "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**, pp. 585-594 (2000).
12. J.E. Sabb, P.M. Godfrey et al., "Adaptive response of rat pancreatic lipase to dietary fat: effects of amount and type of fat", *J. Nutr.*, **116**, pp. 892-899 (1986).
13. J. Ricketts, P.M. Brannon, "Amount and type of dietary fat regulate pancreatic lipase gene expression in rats", *J. Nutr.*, **124**, pp. 1166-1171 (1994).
14. A.I. Lajas, M.J. Pozo et al., "Effect of basic fibroblast growth factor on cholecystokinin-induced amylase release and intracellular calcium increase in male rat pancreatic acinar cells", *Biochem. Pharmacol.*, **55**, pp. 903-908 (1998).
15. M.D. Yago, R.J. Díaz et al., "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**, pp. 242-249 (2006).
16. M.A. Martínez, A.I. Lajas et al., "Dietary virgin olive oil enhances secretagogue-evoked calcium signalling in rat pancreatic acinar cells", *Nutrition*, **20**, pp. 536-541 (2004).
17. F. Maxfield, I. Tabas, "Role of cholesterol and lipid organization in disease", *Nature*, **438**, pp. 612-620 (2005).
18. N. Audi, M.D. Mesa et al., "Membrane lipid composition of pancreatic AR42J cells: Modification by exposure to different fatty acids", *Exp. Biol. Med.*, **232**, pp. 532-541 (2007).
19. J. B. Dietrich, "AR4-2J Cells: A model to study to study polypeptide hormone receptor", *Biosci. Rep.*, **16**, pp. 273-288 (1996).
20. J. Christophe, "Pancreatic tumoral cell line AR42J: an amphiprine model", *Am. J. Physiol.*, **266**, pp. G963-G971 (1994).
21. M. Bozem, S. Kuhlmann et al., "Hormone-stimulated calcium release is inhibited by cytoskeleton-disrupting toxins in AR42J cells", *Cell Calcium*, **28**, pp. 73-82 (2000).
22. J.H. Yu, J.W. Lim et al., "NADPH oxidase and apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar AR42J cells", *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, pp. 590-602 (2005).
23. J.H. Yu, H. Kim et al., "Calcium-dependent apoptotic gene expression in cerulein-treated AR42J cells", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1010**, pp. 66-69 (2003).

## Influence of membrane fatty acid composition on cell viability and lipid peroxidation in a cell model (AR42J) of cerulein-induced acute pancreatitis

C. Santana, M. B. López-Millán, M. A. Martínez-Burgos, M. Mañas, E. Martínez-Victoria and M. D. Yago

*Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology ‘J. Mataix’, University of Granada, Centre for Biomedical Research at the Health Sciences Technology Park, Granada, Spain*

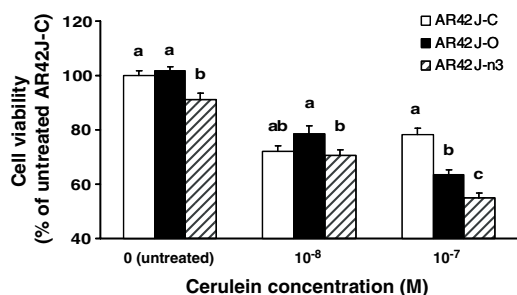
Oxidative stress is a major pathogenic factor in both human and experimental acute pancreatitis<sup>(1)</sup>. Cerulein produces in isolated pancreatic acinar cells large amounts of reactive oxygen species<sup>(2)</sup>, which can then attack the pancreatic membranes directly and also can act as chemoattractants for inflammatory cells<sup>(1)</sup>. We aimed to determine whether modification of membrane fatty acid profile of pancreatic AR42J cells influences cell viability and lipid peroxidation after cerulein treatment.

Membrane fatty acid changes were evoked by culturing AR42J cells for 72 h in medium enriched with 18:1n-9 (50 μM, AR42J-O) or n-3 PUFA (15 μM 20:5n-3 + 10 μM 22:6n-3, AR42J-n3). Cells cultured in standard medium were used as a control (AR42J-C). The detailed procedure is described elsewhere<sup>(3)</sup>. Cells grown in this way were then treated with cerulein for 24 h. Cell viability was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Lipid peroxidation was assessed by measurement of 8-isoprostane in conditioned media using a commercial enzyme immunoassay (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). AR42J crude membranes became enriched in those specific fatty acids added to the medium (Table 1). Cerulein decreased cell viability in all the three groups. For a given concentration, cell viability reached minimum values in AR42J-n3 (Fig. 1). Cerulein increased 8-isoprostane concentration only in AR42J-n3 cells. Comparison between the groups (Fig. 2) shows higher peroxide levels in AR42J-n3 cells for both 10<sup>-8</sup> and 10<sup>-7</sup> M.

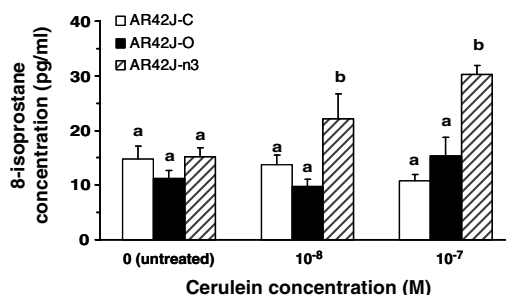
**Table 1.** Percentage of total fatty acid content (n = 10–22). Values with different superscript letters are different at P<0.05 (one-way ANOVA). UI: unsaturation index

	AR42J-C		AR42J-O		AR42J-n3	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
18:1n-9	25.69 <sup>a</sup>	0.41	32.40 <sup>b</sup>	1.11	19.84 <sup>c</sup>	0.53
20:5n-3	0.58 <sup>a</sup>	0.02	0.36 <sup>a</sup>	0.02	4.37 <sup>b</sup>	0.36
22:6n-3	1.87 <sup>a</sup>	0.10	1.08 <sup>b</sup>	0.06	7.08 <sup>c</sup>	0.11
SFA	53.06 <sup>a</sup>	0.40	49.13 <sup>b</sup>	0.95	52.12 <sup>a</sup>	0.75
MUFA	30.02 <sup>a</sup>	0.36	36.90 <sup>b</sup>	0.99	23.58 <sup>c</sup>	0.47
n-6 PUFA	8.57 <sup>a</sup>	0.26	5.05 <sup>b</sup>	0.13	8.06 <sup>a</sup>	0.21
n-3 PUFA	6.28 <sup>a</sup>	0.24	6.55 <sup>a</sup>	0.32	14.11 <sup>b</sup>	0.61
UI	1.55 <sup>a</sup>	0.03	1.54 <sup>a</sup>	0.04	2.30 <sup>b</sup>	0.08

Our results suggest a modulatory role for membrane lipid composition in cell viability and lipid peroxidation in pancreatic acinar cells exposed to aetiologic agents for pancreatitis. This may have pathophysiologic relevance considering that habitual intake of specific dietary fats influences the fatty acid profile of pancreatic membranes *in vivo*<sup>(4)</sup>.



**Fig. 1.** Means with their standard errors (n = 28–56). For a given cerulein concentration, values with different letters are different at P<0.05 (one-way ANOVA).



**Fig. 2.** Means with their standard errors (n = 5–6). For a given cerulein concentration, values with different letters are different at P<0.05 (one-way ANOVA).

This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (AGL-2006-05005).

1. Yubero S, Ramudo L, Manso MA *et al.* (2009) *Biochim Biophys Acta* **1792**, 148–154.
2. Yu JH, Kim KH, Kim DG *et al.* (2007) *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 2063–2075.
3. Audi N, Mesa MD, Martínez MA *et al.* (2007) *Exp Biol Med* **232**, 532–541.
4. Yago MD, Díaz RJ, Ramírez R *et al.* (2004) *Br J Nutr* **9**, 1227–1234.