

00377  
28



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**Facultad de Ciencias**

Respuesta Inflamatoria de las  
células pancreáticas a la  
exposición aguda de tóxicos

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MA. TERESA RAMÍREZ IGLESIAS

Director de Tesis:  
Guillermo B Robles Díaz      Especialista

MÉXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

SEPTIEMBRE, 2003

1



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: María Teresa  
Ramírez Iglesias  
FECHA: 12 de septiembre 2003  
FIRMA: [Firma]



Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 2 de junio de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Ramírez Iglesias María Teresa, con número de cuenta 99810030, con la tesis titulada: "Respuesta inflamatoria de las células pancreáticas a la exposición aguda de tóxicos.", bajo la dirección del(a) Dr. Guillermo Robles Díaz.



|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| Presidente: | Dr. Rolando Hernández Muñoz           |
| Vocal:      | Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz  |
| Secretario: | M. en C. Guillermo Benito Robles Díaz |
| Suplente:   | Dra. Florencia Vargas Vorackova       |
| Suplente:   | Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez    |

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de agosto de 2003.

Dra. Tila María Pérez Ortiz  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2

---

El presente trabajo fue realizado gracias al financiamiento recibido por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** con número de clave: 10814

El presente trabajo fue realizado con el apoyo de la beca **Crédito Otorgada** por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** con número: 130065

**Miembros del Comité Tutorial:**

Tutor principal:

*Guillermo B. Robles Díaz*

Comité:

*Ma. Concepción Gutierrez Ruiz*

*Florencia Vargas Voráckova*

---

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

3

**La Ofrenda**

Le dijo un árbol a un varón: *"Mis orígenes están en la insondable tierra roja, y te daré mi fruto."*  
Y el varón le dijo al árbol: *"¡Qué semejante somos! Mis orígenes también están en la insondable tierra roja.  
Y la tierra roja te proporciona a ti la facultad de ofrendarme tu fruto. Y así mismo es la tierra roja la que me  
alecciona a recibirlo de ti con gratitud."*

*Gibran Jalil Gibran*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

21

## Resumen

**Introducción:** La pancreatitis es la enfermedad más frecuente del páncreas exocrino. El alcohol, es la causa más frecuente de la pancreatitis aguda y crónica. Se ha considerado que puede existir daño directo del alcohol o su metabolito, el acetaldehído al tejido pancreático. Se ha reportado que en el páncreas se lleva a cabo metabolismo del etanol tanto por vía oxidativa como no oxidativa, por lo que se ha sugerido que los radicales libres o los ácidos grasos ester etílicos generados podrían participar también en el daño a la glándula pancreática. En pacientes con pancreatitis aguda grave, se han reportado niveles elevados de endotoxina, por lo que se ha sugerido que el alcohol al alterar la permeabilidad intestinal provoca la traslocación bacteriana y al exponer el tejido pancreático a la endotoxina se incrementa el daño pancreático, produciendo un exceso de citocinas proinflamatorias. Al inicio de la pancreatitis aguda se da lugar a una serie de eventos entre los que se incluyen inflamación, destrucción y respuesta inflamatoria sistémica. En ella se ha supuesto que las células acinares y ductales podrían participar incrementando la producción de estos mediadores de la inflamación. **Objetivo:** Estudiar el efecto del alcohol, acetaldehído y/o lipopolisacárido a través de la secreción y expresión de citocinas proinflamatorias y marcadores de daño celular en dos líneas celulares que representan el parénquima pancreático exocrino. **Materiales y Métodos:** Las células AR42-J (acinares) y Capan-1 (ductales) fueron tratadas por 6 h con alcohol (35 mM), acetaldehído (50  $\mu$ M), lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml), alcohol (35 mM)+lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml) y acetaldehído (50  $\mu$ M)+lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml). Se midió en sobrenadantes celulares la secreción de amilasa (AR42-J) y anhidrasa carbónica (Capan-1) así como TNF- $\alpha$  e IL-6 en AR42-J y en Capan-1 TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8; en las células se determinó la viabilidad celular y se midió la concentración de glutatión y malondialdehído. Por RT-PCR se determinó la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$  y PAP-I para las AR42-J y TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 para las Capan-1. **Resultados:** La viabilidad fue > 90% en las dos líneas celulares después de los tratamientos. Las células AR42-J mostraron valores disminuidos significativamente de amilasa con alcohol, acetaldehído y lipopolisacárido, de glutatión con acetaldehído y lipopolisacárido y solo tendencia ( $p=0.063$ ) a disminuir con alcohol; hubo un incremento significativo de malondialdehído con alcohol+lipopolisacárido y de expresión del ARNm de PAP-I con lipopolisacárido; se observó una tendencia ( $p=0.068$ ) a incrementar la secreción de TNF- $\alpha$  con alcohol, acetaldehído y lipopolisacárido y no se secretó en forma basal, ni con los tóxicos la IL-6. En las Capan-1 sólo se observó una tendencia ( $p=0.06$ ) a disminuir la concentración de glutatión con acetaldehído. **Conclusiones:** Aún cuando la viabilidad y la función celular nos se vio comprometida con ninguno de los tratamientos, las células acinares fueron más sensibles a la exposición a los tóxicos, como se observa en la secreción disminuida de amilasa y la inducción del ARNm de PAP-1 después del tratamiento con lipopolisacárido. Ambas líneas celulares producen TNF- $\alpha$ , y en el caso de las acinares se observa una tendencia a incrementarse después del tratamiento con los tóxicos. Las células ductales fueron capaces de producir IL-6, no así las acinares. El LPS no potenció el daño del alcohol o acetaldehído, sino que lo atenuó. Las

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

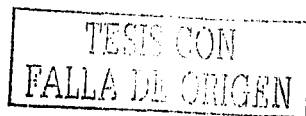


líneas celulares no sufrieron estrés oxidativo, aún cuando se observó disminución en los niveles de glutatión después del tratamiento con acetaldehído (acinares y ductales) y lipopolisacárido (acinares). Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, las células acinares no respondieron a la acción del etanol, acetaldehído y lipopolisacárido a través de la generación de citocinas pro-inflamatorias y aunque las células ductales sí las produjeron no contribuyeron de manera significativa al proceso inflamatorio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Abstract

**Introduction:** Alcohol abuse is associated with the development of both acute and chronic pancreatitis. The pathogenesis of alcoholic pancreatitis is not fully defined. There are several hypotheses on the mechanism of ethanol toxicity to the pancreas. One is that ethanol-induced toxicity is mediated by its metabolites. Both oxidative and nonoxidative pathways of ethanol metabolism have been shown in the pancreas. The direct effects of ethanol and/or its metabolites may be mediated, at least in part, via oxidative stress or the generation of fatty acid ethyl esters. Also, endotoxin is considered to play an important role in the pathophysiology of acute pancreatitis and endotoxemia induces the production of cytokines. It has been suggested that one of the major acute effects of ethanol is to increase intestinal duct permeability, allowing bacterial translocation and leading to pancreatic tissue exposure to endotoxins. Pancreatic damage leads to cytokine-mediated inflammatory response. Acinar and ductal cells may be early sources of cytokine production after a pancreatic insult. **Objective:** To study the effect of ethanol, acetaldehyde and/or lipopolysaccharide on expression and production of pro-inflammatory cytokines and cellular damage markers by exocrine pancreatic cells. **Material and Methods:** Two pancreatic cells lines, AR42-J (rat acinar) and Capan-1 (human ductal) were treated for six hours with either ethanol (35 mM/L), acetaldehyde (50 $\mu$ M/L), lipopolysaccharide (1  $\mu$ g/ml) single or in combined treatments with alcohol (35 mM/L) + lipopolysaccharide (1  $\mu$ g/ml) and acetaldehyde (50 $\mu$ M/L) + lipopolysaccharide (1  $\mu$ g/ml). Cell viability (Trypan blue), reduced glutathione (Tietze method), malondialdehyde (Buege and Aust method), carbonic anhydrase (gasometry AVL) were determined. Amylase, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 secretion were measured by commercially available bioassays. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and PAP-1 expression were determined by RT-PCR. **Results:** The cell viability rate was > 90% in both cell lines. **AR42-J:** Amylase secretion was significantly decreased after alcohol, acetaldehyde and lipopolysaccharide treatments. Reduced glutathione content was significantly decreased after acetaldehyde and lipopolysaccharide treatments and a trend ( $p=0.063$ ) to decrease found with alcohol treatment. Malondialdehyde content significantly increased after alcohol + lipopolysaccharide treatment. The TNF- $\alpha$  secretion trended to increase ( $p=0.068$ ) after alcohol, acetaldehyde and lipopolysaccharide treatments. In these cells, IL-6 secretion was neither produced in control conditions nor induced after any treatments. The PAP-1 expression was significantly increased after lipopolysaccharide treatment. **Capan-1:** The only significant effect of the toxic exposures was that reduced glutathione content decreased ( $p=0.06$ ) after acetaldehyde treatment. **Conclusion:** Acinar cells are more sensitive to the exposure of the toxics studied. Although cell viability does not change, there is evidence of acinar cell function involvement (decreased amylase secretion) and damage (RNAm of PAP-1 induction mainly on lipopolysaccharide exposure). Both cell lines produce TNF- $\alpha$  that trended to increase in acinar cells after toxic treatments. Pancreatic ductal cells, but not acinar cells produce IL-6. Lipopolysaccharide



has not additive effect on pancreatic cell lines response to toxics. Acinar and ductal cells did not suffer damage by oxidative stress even though glutathione content decreases after acetaldehyde (ductal and acinar cells) and lipopolysaccharide (acinar cells) exposure. These findings suggest that *in vitro*, under these experimental conditions, acinar cells does not response to effect of alcohol, acetaldehyde and lipopolysaccharide by production of pro-inflammatory cytokines. Although ductal cells produces these cytokines they do not contribute to inflammatory response.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Lista de Abreviaturas**

ETOH = Etanol

AC = Acetaldehído

LPS = Lipopolisacárido

TNF- $\alpha$  = Factor de necrosis tumoral-alfa

IL-6 = Interleucina 6

IL-8 = Interleucina 8

RT-PCR = Reacción en cadena de la polimerasa-Transcriptasa Reversa

ELISA = Ensayo Inmunoenzimático

PAP I = Proteína Asociada a la Pancreatitis I

GSH = Glutati6n reducido

MDA = Malondialdehído

TBA = Ácido Tiobarbitúrico

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| ANTECEDENTES DIRECTOS .....  | 13 |
| OBJETIVO GENERAL .....   | 19 |
| OBJETIVO PARTICULAR .....  | 19 |
| HIPÓTESIS .....  | 20 |
| METODOLOGÍA .....  | 21 |
| 1. CULTIVOS CELULARES .....  | 21 |
| 2. TRATAMIENTO AGUDO DE 6 HORAS .....  | 21 |
| 3. CÉLULAS CONTROL .....   | 22 |
| 4. PRUEBA DE VIABILIDAD .....  | 22 |
| 5. DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA.....   | 22 |
| 5.1 DETERMINACIÓN DE AMILASA .....   | 23 |
| 5.2 DETERMINACIÓN DE ANHIDRASA CARBÓNICA.....  | 23 |
| 6. DETERMINACIÓN DEL GLUTATIÓN REDUCIDO .....  | 23 |
| 7. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE LIPOPEROXIDACIÓN .....   | 24 |
| 8. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS TNF- $\alpha$ DE RATA, TNF- $\alpha$ ,<br>IL-6 E IL-8 HUMANA ..... | 24 |
| 9. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL .....   | 25 |
| 10. REACCIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA .....   | 25 |
| 11. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA .....  | 25 |
| 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....   | 27 |
| RESULTADOS .....   | 28 |
| TABLA 1 .....  | 32 |
| TABLA 2 .....  | 33 |
| TABLA 3 .....  | 34 |
| TABLA 4 .....  | 35 |
| TABLA 5 .....  | 36 |
| GRÁFICA 1 .....  | 37 |
| GRÁFICA 2 .....  | 38 |
| GRÁFICA 3 .....  | 39 |
| GRÁFICA 4 .....  | 40 |
| GRÁFICA 5 .....  | 41 |



|                    |    |
|--------------------|----|
| GRÁFICA 6 .....    | 42 |
| GRÁFICA 7 .....    | 43 |
| GRÁFICA 8 .....    | 44 |
| GRÁFICA 9 .....    | 45 |
| DISCUSIÓN .....    | 46 |
| CONCLUSIONES ..... | 55 |
| BIBLIOGRAFÍA ..... | 56 |

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Introducción

La pancreatitis es la enfermedad más frecuente del páncreas exocrino (Robles Díaz y col. 1997,1990). Las causas son numerosas y diversos factores y estados de la enfermedad se han asociado al desarrollo de la pancreatitis aguda. Entre éstos, se encuentran los cálculos biliares pancreáticos y el abuso en el consumo de alcohol como las etiologías más comunes. Otras causas menos frecuentes son la hiperlipidemia, infecciones virales, drogas, hipercalcemia, obstrucción ductal y falla en la perfusión pancreática son también causas de pancreatitis. También existe un grupo de casos que se reportan como de etiología idiopática. (Sakorafass y col. 2000).

El abuso de alcohol es la causa más común de la pancreatitis aguda y crónica (Robles Díaz y col. 1990, Sakorafass y col. 2000). Sin embargo, no está claro por qué la pancreatitis clínica se desarrolla sólo en el 15% de los pacientes alcohólicos (Pitchumoni y col. 2002). Las clasificaciones internacionales de pancreatitis en Cambridge 1983 (Robles Díaz y col. 1997), Marsella-Roma 1988 (Sarles y col. 1989) y Atlanta 1992 (Bradley y col. 1993), consideran que la pancreatitis alcohólica se presenta como un estado crónico, que se manifiesta con dolor y/o pérdida permanente de la función pancreática, debidos a la destrucción de la glándula por inflamación crónica y fibrosis.

En un número menor de pacientes, se desarrolla pancreatitis aguda, que se caracteriza por dolor abdominal agudo con un incremento de las enzimas pancreáticas en sangre y orina, inflamación de la glándula y retorno normal de la función pancreática (Robles Díaz y col. 1997). Para algunos autores, la pancreatitis aguda alcohólica (Sarles y col. 1989) corresponde a una manifestación clínica de la pancreatitis crónica, ya que consideran que el daño se presenta sólo después de que se ha consumido alcohol por varios años. Sin embargo, existe un grupo de pacientes en donde hay inflamación y necrosis pancreática aguda secundaria a la ingestión aguda de alcohol sin evidencia de secuela anatómica ni funcional en el páncreas (Backstone y col. 1990, Amman y col. 1994). Aunque algunos pacientes son más susceptibles a desarrollar un cuadro de pancreatitis aguda después de ingerir 20 g de alcohol por día, mientras que existen otros que beben una

1

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cantidad mayor a 200 g por día y no desarrollan la enfermedad (Sarles 1991). También se ha estimado que aproximadamente del 10 al 15% de individuos que consumen grandes cantidades de alcohol desarrollan eventualmente pancreatitis y un número similar desarrolla cirrosis ( Sakorafass y col. 2000).

Los pacientes alcohólicos que presentan pancreatitis tienden a ser más jóvenes que los que padecen cirrosis, mientras que los pacientes con cirrosis tienen una historia más larga de consumo de alcohol, lo que sugeriría que el páncreas es más susceptible a los efectos tóxicos del alcohol. Los factores que influyen en la susceptibilidad individual para cada una de estas condiciones son aún desconocidos (Sakorafass y col. 2000, Haber y col. 1995).

Algunas alteraciones debidas a la toxicidad aguda por alcohol que se relacionan con el desarrollo de pancreatitis se apoyan en diversos estudios experimentales y patológicos, entre éstos se encuentran: cambios en el flujo sanguíneo pancreático que predisponen al daño por isquemia y reperusión con producción de radicales libres; aumento de la permeabilidad ductal que permite el movimiento del contenido del conducto pancreático al espacio intersticial produciendo reflujo de sustancias nocivas (por ejemplo endotoxinas) e incremento de la presión ductal. Otros factores incluyen la activación patológica de gránulos de zimógenos en la célula acinar; incremento en la secreción pancreática y disfunción del esfínter de Oddi, que podría conducir a la obstrucción o reflujo del contenido duodenal (Robles Díaz y col. 1997, Sakorafass y col. 2000, Pitchumoni y col. 2002).

Otra propuesta sobre el daño agudo en el tejido pancreático por alcohol, considera que está dado por un incremento en la presión intraductal con focos de inflamación y fibrosis (Pitchumoni y col. 2002, Sarles y col. 1989) debido a la alteración bioquímica de la secreción pancreática con producción de tapones ductales secundaria al consumo crónico y con la ingesta aguda, la hipertensión ductal favorece al reflujo de enzimas al tejido intersticial. El alcohol, también podría directamente modular la generación de citocinas que conducen a la inflamación y muerte celular, lo



cual podría tener consecuencias serias en la pancreatitis aguda (Robles Diaz y col. 1997, Szabo y col. 1995).

#### Alcohol y Páncreas

El metabolismo del alcohol se lleva a cabo principalmente en el hígado y probablemente el páncreas sólo añade 1% o 2% más a la actividad llevada a cabo por los hepatocitos (Haber y col.1998, Hamamoto y col. 1990). En el páncreas, la principal vía en la oxidación del alcohol involucra a la deshidrogenasa alcohólica, enzima que cataliza la conversión del alcohol a acetaldehído (Gukovskaya y col. 2002).

Otra vía del metabolismo del alcohol que se lleva a cabo en los microsomas de la célula, es la que depende del citocromo P-450. Existen distintos tipos de citocromo P-450 capaces de oxidar el alcohol así como a otros alcoholes y compuestos xenobióticos; el más eficiente es el citocromo CYP2E1, que cataliza la oxidación del alcohol a acetaldehído, reacción que conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno. Este sistema es el único en cuya actividad es inducida por la presencia del alcohol (Rivero Rosas y col. 1997). Se ha reportado que en el páncreas humano están presentes estos citocromos responsables de la generación de especies reactivas de oxígeno, incluyendo el CYP2E1 y que además, está incrementado en pacientes con pancreatitis crónica de etiología alcohólica. (Walling 1998). También Norton y cols. (1998) han demostrado que el CYP2E1 está presente en el páncreas de rata y que además se induce en respuesta a la exposición crónica al alcohol.

Una tercera vía, la no oxidativa, involucra a la sintetasa de ácidos grasos éster etílicos, la cual media la formación de los ésteres etílicos de ácidos grasos a partir del alcohol y los ácidos grasos (De Jersey y col. 1994, Tsujita y col. 1994). Los ésteres etílicos de ácidos grasos, que son producto de la vía no oxidativa del alcohol, se han propuestos como mediadores del daño pancreático inducido por alcohol, ya que se ha observado que estos son capaces de producir vacuolas en la célula acinar y además están involucrados en la fragilidad lisosomal provocada por el alcohol (

Haber y col.1993). Se ha reportado que estas vías están presentes en el páncreas ( Haber y col. 1998, Hamamoto y col. 1990, Walling 1998).

Sin embargo, también se ha considerado que puede existir un daño directo del alcohol o sus metabolitos en las células acinares o quizás ductales que origine lesión anatómica (Estival y col. 1991). Los efectos agudos del alcohol de manera directa pueden afectar la fisiología de la célula acinar y provocar cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, señalización y tráfico celular que contribuyan a sus efectos tóxicos (Robles Díaz y col. 1997). Otros reportes indican que en modelos experimentales, el alcohol por sí solo no causa daño pancreático (Yuasa y col. 1998, Singh y col. 1990), pero sí parece tener efecto sinérgico cuando se combina con otros factores (Gukovskaya y col. 2002, Singh y col. 1990). Estos resultados sugieren que el alcohol contribuye al desarrollo de la pancreatitis aguda cuando existen enzimas activas en el ducto pancreático o cuando la secreción se estimula durante la obstrucción del mismo ( Singh y col. 1990, Gukovskaya y col. 2002).

El alcohol, además de producir daño de manera directa, induce la toxicidad a través de sus metabolitos, principalmente el acetaldehído (Kitson y col. 1996, Hamamoto y col. 1990). Por ejemplo, algunos autores han sugerido que niveles elevados de acetaldehído pueden ocasionar en tejido de páncreas disminución de gránulos de zimógeno y vacuolas citoplasmáticas en la célula acinar (Honda S 1995) y en estudios *in vitro*, con *acinis* pancreáticos, el acetaldehído inhibe la secreción de la amilasa ( Sankaran y col. 1985, Lewin y col. 1985). Por otra parte, la infusión con acetaldehído del páncreas canino aislado y sometido a isquemia produce lesiones pancreáticas por la acción de los radicales libres de oxígeno debido a la presencia de la xantina oxidasa (Nordback y col. 1991, Majumdar y col. 1986). Se sabe que diversos estímulos convierten la xantina deshidrogenasa a su forma activa xantina oxidasa, y entre ellos se encuentran altas dosis de acetaldehído y la presencia de isquemia (Pritsos C 2000). Entonces, un posible mecanismo de daño producido por el acetaldehído es que podría ser oxidado por la xantina oxidasa y en consecuencia producir radicales libres (Nordback y col. 1991, Albano y col. 1994). Por lo tanto, la

asociación entre acetaldehído y pancreatitis podría relacionarse de manera indirecta e involucrar el metabolismo del acetaldehído al activar el sistema de la xantina oxidasa y producir radicales libres (Fridovich I 1989, Nordback y col.1993).

Por otra parte, He y cols. (2001) demostraron que el acetaldehído endógeno *per se* puede producir algunos cambios patológicos como vacuolas en el citoplasma de la célula acinar; sin embargo, algunas alteraciones fisiológicas de pancreatitis como la hiperamilasemia o edema no se desarrolla, por lo que concluyen que son necesarios otros co-factores y un mayor tiempo de exposición al acetaldehído para desarrollar una pancreatitis inducida por alcohol.

El acetaldehído, al ser oxidado a acetato por acción de la deshidrogenasa aldehídica, cuando es producto del metabolismo del alcohol en el hígado, puede escapar hacia la circulación y dañar al páncreas (Lieber 1991). En hepatocitos, se ha demostrado que el acetaldehído se puede unir a proteínas hepatocelulares y formar compuestos que se conocen como aductos que alteran su función e inducen una respuesta inmune, por otra parte, el acetato, puede inhibir la lipólisis y producir la liberación de ácidos grasos y promover la esteatosis (Lieber 1992). Por lo tanto, la presencia del metabolismo de alcohol en páncreas, nos lleva a suponer que el acetaldehído también puede formar aductos con las proteínas pancreáticas e interferir con las funciones celulares, respuestas inmunológicas y estimulación de la fibrogénesis, como lo ha sugerido Niemela y col (2001). Y por otra parte, el acetato en el páncreas, puede servir como sustrato para la síntesis de ácidos grasos, mismos que han sido relacionados a la fragilidad lisosomal observada durante los estadios tempranos del daño pancreático que puede facilitar la liberación de catepsina B y la activación intracelular de enzimas (Haber y col. 1993).

#### Daño pancreático y estrés oxidativo

Se ha establecido que el daño celular generado por los radicales libres está asociado a múltiples alteraciones en la estructura y función celular. Como se señaló antes, el acetaldehído podría participar en este daño. Por otro lado, el metabolismo del alcohol inducido por la presencia del

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

citocromo P-450 y en especial del CYP2E1, podría también promover la generación de especies reactivas de oxígeno. Esta vía podría contribuir al estrés oxidativo durante el consumo del alcohol. Otras posibles fuentes de radicales libres podrían ser la infiltración de células inflamatorias a través del "burst" respiratorio; daño mitocondrial y actividad de la óxido nítrico sintetasa (Schoenberg y col.1995).

Cuando por alguna razón aumenta la producción de radicales libres y la capacidad de los sistemas antioxidantes está disminuida, se establece la situación conocida como estrés oxidativo, en la cual el daño celular es severo y puede conducir a la muerte celular. Existen tres enzimas que son la piedra angular en los sistemas de protección de la célula: la superóxido dismutasa (SOD), que convierte el radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno; la catalasa que remueve el peróxido de hidrógeno cuando está presente en altas concentraciones; la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa, la primera transforma el peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua, en la reacción participan dos moléculas de glutatión reducido (GSH) que ceden sus protones y se forma un enlace disulfuro (GSSG), el GSH se regenera mediante la glutatión reductasa, los peróxidos lipídicos y los lipoperóxidos también son reducidos bajo este sistema (Gutteridge 1995). Se ha señalado que el estrés oxidativo celular está precedido por una disminución en los niveles intracelulares de glutatión (Sweiry y col. 1995). Otras moléculas protectoras a nivel de membrana celular son la vitamina E y  $\beta$ -caroteno y entre otros antioxidantes extracelulares se encuentran la vitamina C, transferrina, lactoferrina, ácido úrico, bilirrubina, albúmina y otras, aunque en algunos casos su eficacia es baja y su acción inespecífica (Gutteridge 1995, Sweiry y col. 1996).

El proceso de oxidación llevado a cabo por los radicales libres, como el hidroxilo e hidroperoxilo en los ácidos grasos poli-insaturados, constituyentes de las membranas biológicas, es conocido como lipoperoxidación. Una de las manifestaciones conocidas en el daño celular generado por este proceso es el aumento en la rigidez de la membrana, caída en el potencial de membrana, incremento en la permeabilidad a  $H^+$  y otros iones, destrucción y muerte celular. Algunos de los productos finales del proceso son citotóxicos, como los aldehídos reactivos, y otros pueden ser

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

útiles como en el caso de la cascada de degradación del ácido araquidónico (Gutteridge 1995). En una revisión que hace Schulz HU y cols. (1999) sobre el estrés oxidativo en pancreatitis aguda, sugieren que la lipoperoxidación es la secuela de la inflamación pancreática y que podría reflejar la severidad de la respuesta inflamatoria sistémica más que el daño al parénquima pancreático.

La generación de radicales libres de oxígeno y aldehídos reactivos, producto de un consumo excesivo de alcohol, ha sido demostrada en estudios con humanos y en modelos experimentales, en los cuales se señala que el acetaldehído y los productos de la lipoperoxidación pueden unirse a proteínas tisulares y formar aductos estables. Estas modificaciones proteicas derivadas del alcohol, también han sido reportadas en otros tejidos expuestos al alcohol y acetaldehído que incluyen el cerebro de ratas, páncreas y músculo (Niemela 2001).

Una actividad y concentración incrementada de radicales libres han sido reportados en pacientes y en modelos experimentales con pancreatitis aguda, tanto en plasma como en tejido pancreático. La contribución de posibles fuentes de radicales libres, como células inflamatorias, xantina oxidasa, citocromo P450 y óxido nítrico sintetasa, no está clara. Se ha relacionado a los radicales libres con la génesis del edema en la pancreatitis aguda, y cuando se ha administrado en forma profiláctica antioxidantes, se ha observado la disminución en la formación del edema pancreático; sin embargo en el caso de la patogénesis de la necrosis pancreática, la relación con los radicales libres, no se ha probado (Schulz y col. 1999). Por otro lado, se ha informado en modelos experimentales, que el incremento de radicales libres se encuentra en las etapas tempranas de la pancreatitis aguda y preceden a la disminución de glutatión reducido y ácido ascórbico ( Kruse y col. 2001, Dabrowski y col. 1999). En estudios *in vitro*, se ha encontrado que en células acinares pancreáticas, aisladas y expuestas a estrés oxidativo, se produce un rápido daño y muerte celular (Schulz y col. 1999, Uruñuela y col. 2002). Por otra parte, se ha observado que existen evidencias clínicas y experimentales que apoyan una relación entre los radicales libres y la isquemia pancreática causado por el metabolismo del alcohol (Sweiry y col. 1996, Weber y col. 1995).

TESTS CON  
FALLA DE ORIGEN

Mediadores de la inflamación.

Una vez iniciada la pancreatitis aguda se da inicio a una serie de eventos entre los que se incluyen inflamación pancreática, destrucción del tejido pancreático y respuesta inflamatoria sistémica. Esta última, es la responsable de la morbilidad y mortalidad de la enfermedad (Bathia y col. 2000). Así, en esta etapa temprana de la pancreatitis, una gran variedad de mediadores de la inflamación que incluyen quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias son generadas por las células acinares, así como también por macrófagos residentes y células endoteliales. Estos mediadores de la inflamación, a su vez activan y atraen otras células inflamatorias que aumentan la permeabilidad microvascular. Por lo tanto, estos leucocitos producen y liberan más citocinas pro-inflamatorias en el tejido pancreático y en el suero. Por otro lado, las células endoteliales y las células acinares incrementan la expresión de las moléculas de adhesión, promoviendo la adhesión de neutrófilos a la superficie endotelial y el secuestro de estos mismos en el parénquima pancreático. En suma, todos estos mecanismos amplifican la respuesta inflamatoria local y sistémica ( Chen y col. 2002, Steer 2002). Estudios clínicos han demostrado que durante la respuesta inflamatoria que ocurre en la pancreatitis aguda, existe un incremento de las proteínas de fase aguda, como fibrinógeno, antiproteasas, ferritina, haptoglobina y la Proteína C reactiva, así como de otras más específicas de páncreas como la Proteína Asociada a la Pancreatitis I (PAP-I). En el caso de estas dos últimas, existe relación clínica con la gravedad de la enfermedad. También, durante el proceso inflamatorio se presenta la producción de citocinas como: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10. (Bathia y col. 2000, Suazo y col. 2000). Varios de estos factores pueden actuar localmente y participar en diferentes etapas de la respuesta inflamatoria.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una de las principales citocinas proinflamatorias, ya que inicia la cascada de respuesta inflamatoria y participa de manera preponderante en el desarrollo de la deficiencia orgánica en pacientes con sepsis o pancreatitis aguda. El TNF- $\alpha$  se sintetiza en los monocitos y macrófagos activados durante la pancreatitis aguda e incrementa la permeabilidad de las células endoteliales, estimulando la producción de radicales libres de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

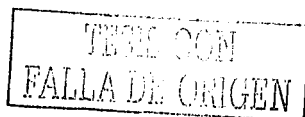
oxígeno. También induce la marginación, atracción y activación de neutrófilos que a su vez liberan de manera directa o indirecta otras citocinas. El incremento de TNF- $\alpha$  tanto en suero como en tejido pancreático correlaciona directamente con la severidad del daño pancreático y la inflamación (Suazo y col. 2000, Bathia y col. 2000).

La IL-1, al igual que TNF- $\alpha$ , es considerada como iniciadora de la cascada inflamatoria, y de hecho la producción de ambas es simultánea. También se ha sugerido que muchos de los efectos de la IL-1 son semejantes a los de TNF- $\alpha$  y que ambas pueden estimular la producción de la otra, lo que demuestra un efecto sinérgico ( Tracey y col. 1990) .

La IL-6 es una citocina producida por un gran número de células entre las que se incluyen monocitos, macrófagos, células endoteliales, etc. en respuesta a estímulos como la endotoxina, la IL-1 y TNF- $\alpha$ . Los niveles de la IL-6 están elevados en el suero de pacientes con pancreatitis aguda, y dicho incremento correlaciona con la severidad de la enfermedad, por lo que se le ha propuesto como un excelente marcador pronóstico en etapas iniciales de la enfermedad (Suazo y col. 2000, Inagaki y col. 1997).

La IL-8 es una potente quimioquina con propiedades quimioatrayentes de neutrófilos que produce también activación de neutrófilos, con lo que se perpetúa la cascada inflamatoria de la pancreatitis aguda. Tanto la liberación de TNF- $\alpha$ , como la presencia de lipopolisacárido en la pancreatitis aguda son los principales estímulos para la producción de IL-8 en los monocitos activados. Su determinación, se ha propuesto de gran utilidad como marcador de gravedad en la pancreatitis aguda, tal como se ha observado en varios estudios en donde los niveles de IL-8 se encuentran elevados en pacientes con pancreatitis aguda y en aquellos que desarrollan insuficiencia orgánica (Suazo y col. 2000).

A nivel de células acinares aisladas y de tejido pancreático, se ha encontrado que tanto en ratas control como aquellas ratas con pancreatitis aguda son capaces de producir, secretar y responder



a TNF- $\alpha$  (Gukorvskaya y col. 1997). En otro estudio, se encontró que células acinares aisladas de rata y estimuladas con y sin neutrófilos activados, también eran capaces de expresar y secretar TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Kim y col. 2000). En tejido pancreático de ratas con pancreatitis, se detectó en las etapas tempranas tanto la expresión del ARNm como la presencia de la proteína de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y entre las 4 h y 6 h después, la expresión y presencia de la proteína de IL-6 (Norman y col.1997). En la línea celular pancreática las AR42-J, se ha reportado que mantiene las características específicas del *acini* del páncreas como son la actividad de las enzimas exocrinas como la secreción y expresión de amilasa, de la esterasa de colesterol dependiente de las sales biliares y que también tienen la capacidad de secretarla en respuesta al tratamiento con alcohol (Le Petit-Thevenin y col. 1998), y que son capaces de expresar y producir IL-8 en respuesta a varios estímulos (Vaccaro y col. 2000, Xie y col. 2002). En líneas celulares ductales, (Capan-1), se ha reportado que son incapaces de producir amilasa o elastasa que son marcadores acinares típicos, aún cuando bajo ciertas condiciones, se ha visto que pueden expresar ARNm para tripsina y ribonucleasa, pero sí son capaces de secretar anhidrasa carbónica, enzima característica de los conductos pancreáticos. (Fernández y col. 1994). Por otro lado, estas células producen IL-6 e IL-8 en respuesta a la endotoxina y TNF- $\alpha$  (Blanchard y col. 2000).

La PAP es un reactante de fase aguda, cuyos niveles son casi indetectables en sujetos normales, pero que durante el daño agudo el páncreas aumenta su síntesis en forma significativa. Ortiz y col. (1998) han sugerido que las células acinares expresan PAP en respuesta a la agresión y que además, ésta es capaz de proteger a las células acinares del daño producido por los radicales libres o de la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ . También el mismo grupo, ha reportado que las células AR42J expresan la PAP-1 en respuesta al LPS (Vaccaro y col. 2000).

Uno de los estímulos más potentes para la producción de citocinas es la presencia del lipopolisacárido que se produce a partir de la destrucción de las bacterias Gram-negativas. Se ha sugerido que la endotoxemia proviene del tracto gastrointestinal, por lo que la ruta que sigue la migración de estos microorganismos del lumen intestinal al páncreas podría suponer la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



translocación bacteriana, sugiriendo una falla en la barrera intestinal ( Suazo y col. 2000, Ammori y col. 1999).

Se ha detectado endotoxemia en sangre periférica de pacientes con pancreatitis aguda grave, y niveles significativamente elevados se detectaron en pacientes quienes desarrollaron falla orgánica múltiple o murieron (Ammori y col. 1999, Swank y col. 1996, Exley y col. 1992). Así, la mayor morbilidad y mortalidad de la pancreatitis aguda se ha relacionado con la sepsis por infección de la necrosis pancreática y peripancreática (Fernández del Castillo y col 1993). También se ha confirmado que después de una pancreatitis necrosante, un grupo considerable de pacientes sufre de insuficiencia exocrina y endocrina (Beger y col. 1997)

En modelos animales, la administración intraperitoneal de LPS de *Escherichia coli* aumenta significativamente el contenido de enzimas pancreáticas y produce respuesta inflamatoria (Nonaka y col. 1989). Esto hace suponer que en los casos en que se desarrolla el daño peri-pancreático, por ejemplo en pancreatitis aguda por consumo prolongado de alcohol, puede agravarse la lesión tisular por la presencia de toxinas bacterianas, que al incrementar la permeabilidad de la pared intestinal contribuiría a la endotoxemia y en consecuencia, respuesta inflamatoria de las células linfáticas y pancreáticas ( Posar y col. 1997, Wig y col. 1998, Blanchard y col. 2000). Así, Fortunato F y col (2000) han sugerido que el consumo prolongado de alcohol podría sensibilizar a la célula acinar al daño inducido por la endotoxina, y por lo tanto aumentar la posibilidad de que mecanismos similares puedan causar pancreatitis en pacientes alcohólicos.

Por otra parte, se ha comprobado que cuando ocurre obstrucción biliar, se altera el mecanismo de control del sistema inmune del árbol biliar, favoreciendo la traslocación bacteriana a la bilis, factor que podría ser importante en la patogénesis de la pancreatitis biliar (Suazo y col. 2000).

Por lo tanto, la endotoxemia puede actuar a través de diferentes mecanismos de manera directa o a través de la producción y liberación incrementada y descontrolada de citocinas pro-inflamatorias,

TEMAS  
FALLA DE ORIGEN

incrementar la permeabilidad intestinal, deteriorar el sistema inmune del huésped y promover la traslocación bacteriana (Ammori y col. 1999).

### Lineas celulares

Existen en la actualidad diversas líneas celulares pancreáticas, entre ellas se encuentran las dos que representan a las poblaciones celulares características del parénquima pancreático exocrino:

- 1) Línea celular AR42J (Pancreatic tumor rat) de origen acinar de tumor de rata, (ATCC, Rockville, MD), que conserva características fenotípicas de células acinares como ya se mencionó antes.
- 2) Línea celular CAPAN-1 de adenocarcinoma de páncreas humano de origen ductal, conserva la capacidad de producir la secreción característica hidro-electrolítica de los conductos pancreáticos, es decir, la actividad de anhidrasa carbónica, las mucinas, algunos marcadores epiteliales como citoqueratinas específicas y otras enzimas no digestivas.

Por lo que consideramos que con estas dos líneas celulares se puede diseñar un modelo que estudie *in vitro* la respuesta inflamatoria del parénquima del páncreas a exposiciones agudas a diferentes tóxicos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Antecedentes directos

La pancreatitis aguda se define como un trastorno inflamatorio del páncreas con afección de los tejidos peri-pancreáticos o de sistemas orgánicos a distancia. Se caracteriza por dolor abdominal de inicio rápido y agudo con grados variables de intensidad. Sus manifestaciones clínicas consisten en náusea, vómito, fiebre, taquicardia, leucocitosis y elevación de las enzimas pancreáticas, como la amilasa en suero y orina. (Ho ycol. 2000)

El abuso en el consumo de alcohol, es el factor etiológico más frecuente de la pancreatitis siendo esta etiología la que predomina en el sexo masculino (Robles Díaz y col. 1997). A pesar de la vinculación entre la pancreatitis y el abuso de alcohol, se desconocen los mecanismos que ocasionan el daño pancreático por alcohol.

Con la finalidad de estudiar la patogénesis de la pancreatitis aguda alcohólica, Gronroos y col. (1994) encontró que en ratas que consumen alcohol en un periodo de tiempo corto, existe un decremento en el número de receptores muscarínicos, y en consecuencia al incrementarse el tono colinérgico se predispone a la pancreatitis aguda. Otros investigadores han propuesto algunas teorías que podrían explicar la patogénesis de la pancreatitis aguda, una de ellas propone que el alcohol al reducir el tono del esfínter de Oddi, facilita el reflujo del contenido duodenal al ducto pancreático, de tal manera, que la enterocinasa presente en el jugo duodenal active las enzimas pancreáticas, permitiendo que se difundan al intersticio pancreático causando pancreatitis aguda. Otra teoría propone que el alcohol causa espasmos en el esfínter de Oddi, creando un canal común entre el ducto biliar y conducto pancreático, de tal manera que el reflujo del ducto biliar al pancreático causa la pancreatitis. También, se ha propuesto que la secreción del jugo pancreático rico en proteínas, conduce a la formación de tapones en los ductos pancreáticos produciendo obstrucción, inflamación y degeneración del área pancreática, produciendo así pancreatitis crónica y en cualquier caso, el daño es mayor si las endotoxinas están presentes (Singh y col. 1990, Robles-Díaz y col. 1997).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

También se ha propuesto que el alcohol y sus metabolitos pueden tener efecto directo en la fisiología de la célula acinar alterando la permeabilidad de la membrana celular, tráfico de proteínas y vías de señalización intracelular (Robles Díaz y col. 1997).

Por otra parte, Hoek y col (1992) y Ponappa y col. (1987) observaron que el alcohol produce un incremento en los niveles intracelulares de calcio, que conduce a una activación intra-pancreática de los gránulos de zimógeno (Katz y col. 1996) y a una posible formación de vacuolas en la célula acinar (Singh y col. 1990).

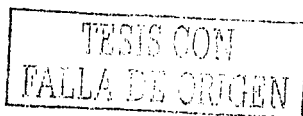
Actualmente, existe evidencia de que el páncreas es vulnerable al daño producido por especies reactivas de oxígeno (Gut y col. 1994). En el jugo pancreático de pacientes con pancreatitis alcohólica se ha reportado niveles elevados de peróxidos lipídicos (Guyan y col. 1990, Braganza y col. 1983). Estos hallazgos se han asociado a cambios en el estado redox de la célula con la consecuente caída en los niveles de los sistemas de defensa antioxidante como el GSH y el ácido ascórbico (Sweiry y col. 1996). En otro estudio llevado a cabo en ratones con pancreatitis aguda inducida con ceruleína, se observó que en el tejido pancreático, la concentración del GSH había disminuido dramáticamente, indicando que los radicales libres, al inducir estrés oxidativo, eran los responsables de una marcada liberación de productos lipoperoxidativos (Neuschwander-Tetri y col. 1992, Dabrowski y col. 1990, Schoenberg y col. 1990).

Se ha reportado que en el páncreas total se lleva a cabo la oxidación del alcohol, vía la deshidrogenasa alcohólica (Gukovskaya y col. 2002) y que *acinis* pancreáticos aislados de rata también son capaces de oxidar el alcohol, a través de la deshidrogenasa alcohólica tipo III (Haber y col. 1998). Se ha informado que el citocromo CYP2E1 está presente en el páncreas humano y que es inducido por la ingesta crónica de alcohol en pacientes con pancreatitis alcohólica (Norton y col. 1998). La vía no oxidativa, también está presente en el páncreas y los ésteres etílicos de ácidos grasos formados como productos de esta vía, participan en el daño a la célula acinar y a la fragilidad lisosomal (Haber y col. 1993).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Algunos investigadores han mostrado interés en estudiar los efectos del metabolismo de alcohol en el páncreas. Altomare y col. (1996) estudiaron en ratas el efecto de la ingestión aguda al alcohol y su relación con el estrés oxidativo, en el que concluyeron que el alcohol reduce el contenido del GSH pancreático con un incremento en los niveles del MDA y glutatión oxidado, y que además este incremento podría deberse más bien al acetaldehído, producto del metabolismo del alcohol, y que por lo tanto era responsable de los daños oxidativos en las células pancreáticas. De hecho, Nordback y col. (1991) en un modelo experimental, encontraron que el acetaldehído es capaz de inducir pancreatitis aguda y que además era el responsable de los efectos tóxicos del modelo *in vivo* debido a la presencia de radicales libres. Se ha reportado que el acetaldehído puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo, por ejemplo del GSH, y por lo tanto contribuir a su decremento, además de que es capaz de unirse a estructuras celulares y formar aductos proteicos (Lauterburg y col. 1988, Niemela O 2001). Otros investigadores han reportado en un modelo experimental, que el acetaldehído puede provocar la formación de vacuolas en la célula acinar y disminuir el número de gránulos de zimógeno, pero que por sí mismo no produce pancreatitis (Honda y col. 1995, He y col. 2001).

Los efectos del metabolismo del alcohol en el páncreas podrían ser contrarrestados por los sistemas antioxidantes presentes en la célula y en los cuales el GSH juega un papel importante. Neuschwander-Tetri y col. (1992), encontraron que el páncreas tiene una alta capacidad de sintetizar GSH. También se ha reportado que el páncreas tiene sólo una cuarta parte de la concentración de GSH que contiene el hígado (Githens y col. 1991), de tal manera que el GSH juega un papel importante en las funciones normales de la célula acinar, como el proceso de detoxificación de xenobióticos (Segal I 1998). Otras enzimas que forman parte de los sistemas de defensa contra los radicales libres son la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa. Algunos investigadores han observado en modelos experimentales de pancreatitis aguda inducida con ceruleína, que los niveles de SOD y catalasa se encontraban disminuidos, y en el modelo con taurocolato de sodio, los niveles de catalasa estaban incrementados mientras que los de SOD disminuidos. Así, que los niveles de antioxidantes enzimáticos en el páncreas pueden variar entre



los diferentes modelos y quizá entre las especies utilizadas en los mismos (Sweiry y col. 1996, Schoenberg y col. 1995). Existen otros estudios en los que se ha reportado que pacientes con pancreatitis aguda tienen niveles disminuidos de antioxidantes no enzimáticos como vitamina A, C, E y selenio (Schoenberg y col. 1995) y que el tratamiento con antioxidantes o recolectores de radicales libres, es aún controversial (Schoenberg y col. 1995, Schulz y col. 1999).

Durante la pancreatitis, se da inicio entre otros eventos a una respuesta inflamatoria local y sistémica. Como respuesta al daño tisular pancreático, los macrófagos activados liberan citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ). Generalmente, son secretadas en forma transitoria y local en respuesta a estrés, infección o daño tisular, actuando en forma paracrina o autocrina (Lowry SF 1993). Existe evidencia de que las citocinas inflamatorias juegan un papel importante en la exacerbación de la pancreatitis aguda y en el desarrollo de su complicación sistémica (Osman y col. 1999). La importancia de las citocinas en la pancreatitis aguda, se deriva de las siguientes observaciones: niveles elevados de citocinas inflamatorias tanto en el suero de pacientes con pancreatitis aguda complicada como en animales de experimentación con pancreatitis; y en el hecho de que en modelos experimentales con pancreatitis aguda severa, al bloquear la acción de estas citocinas se reduce las complicaciones sistémicas y por lo tanto mejora la tasa de sobrevivencia (Schomerich J 1996).

El TNF- $\alpha$  que es una citocina pleiotrópica, estimula la producción de otras citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 e IL-8 (Schomerich J 1996). Diversos grupos de investigación han demostrado el incremento de TNF- $\alpha$  tanto en pacientes con pancreatitis como en diferentes modelos experimentales, en los que han observado una correlación positiva con la severidad de la enfermedad (De Beaux y col. 1996, Exley y col. 1992). Se ha informado que en modelos experimentales con pancreatitis aguda, el TNF- $\alpha$  se produce localmente y a distancia, y que la producción local precede a su elevación sistémica (Norman y col. 1995). Por hibridación *in situ*, se ha demostrado en ratas con pancreatitis aguda una fuerte expresión de TNF- $\alpha$  en la región perinuclear de la célula acinar (Fomela y col. 1994), y por otro lado Gukovskaya y col. (1997)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

encontraron que *acinis* pancreáticos de rata con pancreatitis aguda y en los de ratas control, así como en *acinis* aislados tienen la capacidad de secretar, producir y responder a TNF- $\alpha$ . También se han relacionados los niveles séricos de IL-6 con la severidad de la pancreatitis aguda, de tal forma que se ha sugerido que su determinación en el suero de pacientes con pancreatitis aguda, puede ser útil como marcador pronóstico de la enfermedad (Osman y col. 1999, Tran y col. 1993). La IL-8, potente quimioatrayente de neutrófilos, se ha encontrado elevada en el suero de pacientes con pancreatitis aguda, mostrando correlación con el curso clínico de la enfermedad, lo que sugiere que la IL-8 juega también un papel importante en la propagación de la pancreatitis hacia la respuesta inflamatoria sistémica (Osman y col. 1999). En modelos experimentales con pancreatitis, se ha observado que los niveles séricos de IL-8 se encuentran incrementados (Osman y col. 1999) y también se ha demostrado la expresión de IL-8 en *acinis* y ductos pancreáticos de conejos con pancreatitis aguda necrosante (Exley y col. 1992), indicando una producción local de esta citocina en la pancreatitis experimental.

En pacientes con pancreatitis aguda grave, la sepsis y la falla orgánica múltiple, son las principales causas de muerte. En estos enfermos y en modelos experimentales, el deterioro en la barrera intestinal conduce a un incremento en la permeabilidad, de tal forma que tanto favorece la traslocación bacteriana así como la de los fragmentos bacterianos, como es el caso del lipopolisacárido (LPS), y de macromoléculas (Swank y col. 1996, Mann y col. 1994), por lo tanto se ha identificado al tracto gastrointestinal como una fuente importante de infección durante la pancreatitis (Runkel y col. 1991). Por otra parte, Ammori y col. (1999) observaron un incremento temprano en la permeabilidad intestinal de pacientes con pancreatitis aguda severa y que además correlaciona con la endotoxemia, con la falla orgánica y la mortalidad. Beaux y col. (1996) encontraron en el suero de pacientes con pancreatitis aguda necrosante niveles elevados de endotoxina. La endotoxemia sistémica puede ejercer sus efectos al estimular a los granulocitos a producir TNF- $\alpha$  e IL-1, y al activar esas citocinas, los macrófagos producen IL-6, como respuesta a la fase aguda y continuar de esta manera amplificando la respuesta inflamatoria (Bhatia y col. 2000). Por otra parte, en pacientes con pancreatitis aguda, los niveles elevados de endotoxina en

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

suero fueron asociados a concentraciones elevadas de TNF- $\alpha$  e IL-6, que correlacionaron en forma positiva con la severidad de la enfermedad (Suazo y col. 2000). Otros investigadores han sugerido que la endotoxemia puede deteriorar los procesos de secreción exocrina de las células acinares (Nonaka y col. 1989).

Tomando en cuenta los puntos arriba señalados, se ha sugerido que cuando existe daño pancreático, el alcohol podría contribuir al daño tisular y al incrementar la permeabilidad sensibilizar a las células acinares que junto con la presencia de endotoxinas se podría acrecentar la respuesta inflamatoria de las células linfáticas y pancreáticas, como lo ha sugerido Fortunato y col. (2000).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### Objetivo general

- Estudiar en dos líneas celulares representativas del parénquima pancreático exocrino el efecto del alcohol, acetaldehído y/o LPS en concentraciones de relevancia clínica a través de la secreción y expresión de citocinas proinflamatorias y marcadores de daño celular, y si el LPS es capaz de potenciar el efecto del alcohol y del acetaldehído.

### Objetivo particular

- Determinar la viabilidad en ambas líneas celulares después de someterlas por 6 h a la exposición a diferentes dosis de alcohol, acetaldehído y/o LPS.
- Determinar la secreción de amilasa, secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6 y expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 así como de la PAP I en células pancreáticas acinares en respuesta a la exposición aguda al alcohol, acetaldehído y/o LPS.
- Determinar la secreción de anhidrasa carbónica, secreción y expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en células ductales pancreáticas en respuesta a la exposición aguda al alcohol, acetaldehído y/o LPS
- Estudiar en ambas líneas celulares, la presencia de estrés oxidativo por la exposición aguda al alcohol, acetaldehído y/o LPS a través de la lipoperoxidación y niveles de glutatión.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Hipótesis

- Dos líneas celulares representativas del parénquima pancreático exócrino van a secretar y expresar citocinas proinflamatorias y marcadores de daño celular de manera diferencial después de la exposición aguda al alcohol, acetaldehído y/o LPS. Este último es capaz de potenciar el efecto del alcohol y del acetaldehído.
- La viabilidad de las dos líneas celulares va a ser alta después de exponerlas en forma aguda al alcohol, acetaldehído y/o LPS.
- Las células pancreáticas acinares van a disminuir la secreción de amilasa e incrementar la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6 y la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 y PAP-I después de la exposición aguda al alcohol, acetaldehído y/o LPS.
- Las células pancreáticas ductales van a disminuir la secreción de anhidrasa carbónica e incrementar la secreción y expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 después de la exposición aguda al alcohol, acetaldehído y/o LPS.
- Las dos líneas celulares van a presentar estrés oxidativo a través de un incremento en los niveles de lipoperoxidación y disminución en el del glutatión, después de la exposición aguda al alcohol, acetaldehído y/o LPS.

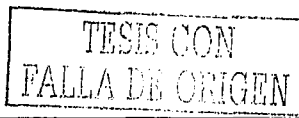
## Metodología

### 1.- Cultivos celulares

Las líneas celulares AR42-J (pasaje 39) y CAPAN-1 (pasaje 18, ATCC, Rockville, MD) se cultivaron en medio Dubelco modificado por Eagle y suplementado con 10% de suero fetal bovino (BIOWITHAKER), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (GIBCO BRL). Las células se mantuvieron en incubación con 5% de bióxido de carbono y humedad a saturación, en botellas de cultivo celular (Costar). El medio de cultivo se cambió cada tercer día y las células se resembraron cada 5 días.

### 2.- Tratamiento agudo de 6 horas

Las líneas celulares se sembraron en botellas de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> de área y 24 h después el medio se cambió por uno conteniendo una concentración inicial ya sea alcohol (ETOH) 35mM; acetaldehído (AC) 50µM; lipopolisacárido (LPS) 1µg/ml; alcohol (ETOH) 35mM + lipopolisacárido (LPS) 1µg/ml o acetaldehído (AC) 50µM + lipopolisacárido (LPS) 1µg/ml. Las botella fueron cerradas de inmediato y selladas con cinta teflón. Es importante señalar que en el caso de las células Capan-1 y con el fin de no interferir con las mediciones de bicarbonato en el medio, éste se preparó como se mencionó antes pero con la diferencia de que se utilizó como solución amortiguadora HEPES 25 mM en lugar de bicarbonato de sodio. Después de 6 h de exposición con los tóxicos señalados, las células fueron lavadas con PBS, raspadas con un gendarme de goma para despegarlas de la botella y resuspendidas en PBS para la determinación de glutatión y lipoperoxidación. El medio fue separado, centrifugado y almacenado a -70°C en alícuotas para la determinación de citocinas TNF-α humana, TNF-α de rata, IL-6 e IL-8 y de amilasa, en el caso de las células AR42-J; para la determinación de anhidrasa carbónica en las células Capan-1, el medio se utilizó en fresco y se llevó inmediatamente al gasómetro para medir bicarbonato. En ambas líneas celulares, después de las 6 h de tratamiento con ETOH (35 mM), AC (50µM), LPS (1 µg/ml), ETOH (35mM) + LPS (1 µg/ml) y AC (50µM) + LPS (1 µg/ml), se realizó la extracción del ARN total, por la técnica de Chomczynski y Sacchi. En el caso de las células AR42-J, se midió la expresión



del ARNm de la PAP-I y TNF- $\alpha$  y  $\beta$ -Actina (control interno). Los resultados fueron expresados como la relación entre la PAP-I y  $\beta$ -Actina, y en el caso de TNF- $\alpha$  en pg/ $\mu$ l; con respecto a las células Capan-1, se midió la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 y los resultados fueron expresados en pg/ $\mu$ l.

Para evitar la evaporación del alcohol y acetaldehído, los medios se prepararon en el momento cada vez que fueron agregados al medio de cultivo.

### 3.- Células control

Cada condición experimental tuvo su control, que fueron las células sembradas a la misma densidad y que se mantuvieron bajo las mismas condiciones que las células tratadas con los tóxicos, pero sin la adición de los mismos.

### 4.- Prueba de viabilidad

La de viabilidad se determinó con la prueba de exclusión del azul de tripano al 0.4%. Las células se sembraron en pozos de 35 mm de diámetro y se trataron con los diferentes tóxicos a las concentraciones antes señaladas. Después de las 6 hr de tratamiento, las células se lavaron con PBS y se trataron con tripsina-EDTA al 0.05%, después de recuperar las células fueron resuspendidas en el medio y una alícuota fue diluida con una parte de azul de tripano y dos de PBS y posteriormente se contaron con un hematocitómetro. Las células se consideraron viables cuando no incorporaron el colorante, mientras que aquellas que tiñeron el núcleo fueron consideradas no viables. El número total de células fue calculado de la siguiente manera:

$$\# \text{ de células no teñidas} / 4 \times 10\,000 \times \text{factor de dilución} = \# \text{ células} / \text{ml}$$

### 5.- Determinaciones Enzimáticas

Con el fin de conocer la integridad celular, de manera paralela se realizó la determinación en los medios de cultivo de la amilasa en las células AR42-J y anhidrasa carbónica en células Capan-1.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 5.1 Determinación de Amilasa

La determinación de amilasa se realizó con el método colorimétrico enzimático  $\alpha$ -Amilasa EPS de la casa comercial Boehringer Mannheim. Este método utiliza como sustrato p-nitrofenol- $\alpha$ ,D-maltohetosido. El principio se fundamenta en la acción de la amilasa presente en la muestra sobre el sustrato, produciendo maltósidos de cadenas mas pequeñas unidas a p-nitrofenol, cuando éste queda libre del maltósido produce un color amarillo que puede leerse en un espectofotómetro a 405 nm. Se disuelve 1 tableta con 2 ml del amortiguador por muestra a temperatura ambiente, se agrega 100  $\mu$ l de la muestra problema y se incuba 4 min. Se lee la absorbancia al minuto 4, 5, 6 y 7. Se determina el cambio de extinción promedio por minuto y se multiplica por 7000, que es el factor dado por la casa comercial. El resultado se expresa en mU x millón de células.

### 5.2 Determinación de Anhidrasa Carbónica

La actividad de la anhidrasa carbónica se realizó por medio del gasómetro AVL OMNI. Una vez terminado el tratamiento indicado en la sección 3, el medio de cultivo es extraído por medio de una jeringa, colocada en hielo y llevada de inmediato al gasómetro (AVL OMNI) el cual midió el bicarbonato como producto de la actividad de la anhidrasa carbónica. El gasómetro es calibrado con los estándares marcados por la casa comercial y cumplida esta condición, se inyecta la muestra y se obtiene el resultado en mmol/L de bicarbonato. El resultado se expresa mmol x millón de células.

### 6.- Determinación de glutatión reducido (GSH)

Para la determinación de GSH se utilizó la técnica de Tietze ( Tietze 1969). El contenido de GSH de la muestra se determinó por acción del reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB), que en presencia de grupos tioles (SH), da como resultado una coloración amarilla. Con el fin de precipitar proteínas, las células son tratadas con ácido sulfosalicílico al 4% y se deja en reposo toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la muestra se centrifuga a 3000 rpm durante 10

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

minutos; del sobrenadante se toman 100  $\mu$ l y se le agrega 700  $\mu$ l de una solución buffer de fosfatos y 50  $\mu$ l de DTNB, se agita y al cabo de 10 min se lee la absorbancia a 412 nm. La cuantificación de los grupos tioles se realiza en base a una curva estándar de GSH. Los resultados se expresan en nmol de grupos SH por millón de células.

#### 7.- Determinación del grado de lipoperoxidación

El grado de lipoperoxidación se determinó mediante el método de Buege y Aust (Buege y col. 1978), el cual tiene su fundamento en la formación de malondialdehído (MDA) en presencia de ácido tiobarbitúrico. Las células son resuspendidas en PBS de donde se separa una alícuota para la determinación de proteínas (método de Bradford). Al resto de la muestra se le adiciona 2 ml de una solución reactiva de ácido tricloroacético al 15%, ácido tiobarbitúrico al 0.5% y ácido clorhídrico al 0.25 N. Las muestras se agitaron e incubaron en un baño a ebullición por 25 min. Al cabo de este tiempo, las muestras son enfriadas en hielo y centrifugadas a 3000 rpm por 10 min. La absorbancia del sobrenadante es leída a 535 nm. El coeficiente de extinción de  $1.56 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  es utilizado para calcular la concentración de MDA. Los resultados se expresan en nmol de MDA / mg de proteína.

#### 8.- Determinación de citocinas TNF- $\alpha$ de rata, TNF- $\alpha$ humana, IL-6 e IL-8

En los medios de cultivo se determinaron por ELISA la secreción de las siguientes citocinas: TNF- $\alpha$  humana, TNF- $\alpha$  de rata, IL-6 e IL-8 con los equipos Quantikine Human y Quantikine Murine de R&D Systems. La técnica tiene su fundamento en que un anticuerpo monoclonal específico para cada una de las citocinas a determinar está cubriendo los pozos de las placas correspondientes, las muestras y estándares son pipeteados en el pozo correspondiente. Estos se unen al anticuerpo inmovilizado en el pozo, y las proteínas no unidas se desechan con varias lavadas; después se agrega a cada pozo un anticuerpo policlonal específico para cada una de las citocinas unido a una enzima. El color desarrollado y la intensidad del mismo se lee en un lector de microplaca a 450 nm con filtro de referencia a 540 nm. Los resultados se expresan en pg / millón de células.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 9.- Extracción de ARN total

Se utilizó la técnica de Chomczynski (1987) para la extracción del ARN total. Después del tratamiento con cada uno de los tóxicos, las células son lavadas dos veces con PBS, posteriormente se les agrega 1 ml de solución desnaturalizante, se homogenizan y se colocan en tubos de 1.5 ml, después se les agrega acetato de sodio 2 M pH 4.8, fenol saturado caliente, a continuación se les agrega cloroformo-alcohol isoamílico (25:1) después de la adición de cada reactivo se agitan vigorosamente. Se incuban 10 min a 4°C, después se centrifugan a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, la fase superior acuosa es separada y transferida a otro tubo de 1.5 ml, al cual se le adiciona NaCl 4 M y etanol frío al 95%. Se precipita toda la noche, y posteriormente es centrifugada 30 min a 4°C a 14,000 rpm, se desecha el sobrenadante y el botón es resuspendido en 20 µl de agua dietil pirocarbonato (DEPC). Para la cuantificación del ARN, el botón es diluido 1:250 con agua DEPC, enseguida se lee la densidad óptica en un espectrofotómetro marca Beckman DU 65 a una longitud de onda de 260 y 280; la concentración total se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Concentración} = \text{Abs}_{260} \times 250 \times 0.04 = \mu\text{g}/\mu\text{l}.$$

### 10.- Reacción de la Transcriptasa Reversa

La reacción de la transcriptasa reversa (RT) seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada en ARN de las células Capan-1 humanas se utilizó como control interno poliespecífico el plásmido pQA-1 que contiene las secuencias de los genes de interés. La reacción de la RT se realizó con mezclas del ARN total obtenido de las células y con el ARN estándar del plásmido pQA-1. Se utilizaron 2 µl del ARN total celular, que fueron desnaturalizados 5 min a 70°C y colocados inmediatamente en hielo. Después se les agregó 100 ng del oligonucleótido iniciador (Oligo d(T)), 50 U de transcriptasa reversa del virus de la Leucemia Murina Moloney (Gibco-BRL) y 0.5 M de cada uno de las 4 deoxinucleótidos trifosfato (GIBCO-BRL) para obtener un volumen final

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de 20  $\mu$ l. La reacción se llevó a cabo durante 60 min a 42°C seguida de 5 min a 95°C en un termociclador (Perkin-Elmer Co. Norwalk, CT, EUA). Además, para la RT-PCR cuantitativa que se realizó para la expresión de citocinas, se cuantificó la  $\beta_2$ - microglobulina como un gen estructural en todos los ARN celulares.

11.- Reacción en cadena de la polimerasa.

El ADNc fue mezclado con 30 pM de cada uno de los iniciadores sentido y antisentido de cada una de las citocinas, 0.5 M de deoxinucleótidos trifosfato y 2 U de Taq ADN polimerasa (Perkin-Elmer). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 5 min, 57°C por 1 min y 72°C por 1 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 1 min, 57°C por 1 min y 72°C por 5 min), y al final un ciclo de 72°C por 10 min, el proceso se llevó a cabo en un termociclador marca Perkin Elmer. Una alícuota de la RT-PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y visualizado por tinción con bromuro de etidio. Una RT-PCR semicuantitativa se realizó en las células AR42-J utilizando iniciadores específicos para PAP-1 y  $\beta$ -Actina que fue utilizada como control interno, por lo que los resultados se expresaron como píxeles y para la expresión de las citocinas tanto en células AR42-J como en las Capan-1, se realizó una RT-PCR cuantitativa por lo que los resultados se expresaron como pg/ $\mu$ l.

Los iniciadores utilizados para la expresión de citocinas humanas fueron los siguientes:

TNF- $\alpha$  sentido 5' ACAAGCCTGTAGCCCATGTT 3'  
antisentido 5' AAAGTAGACCTGCCAGACT 3'

IL-6 sentido 5' TCAATGAGGAGACTTGCCTG 3'  
antisentido 5' GATTGAGTTGTCCATGTCCTGC 3'

IL-8 sentido 5' TTGCAGCCTTCCTGATT 3'  
antisentido 5' AACTTCTCCACAACCCTCTG 3'

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Los iniciadores utilizados para la expresión de la PAP-1,  $\beta$ -Actina y TNF- $\alpha$  de rata fueron los siguientes:

$\beta$ -Actina      sentido 5' TGGTGGGTATGGGTCAGAAGG 3'  
                  antisentido 5' ATCCTGTCAGCGATGCCTGGG 3'

PAP I          sentido 5' GAAGACTCTCCGAAGAAAATACCC 3'  
                  antisentido 5' ACCTGTAAATTTGCAGACGTAGGG 3'

TNF- $\alpha$         sentido 5' CTCTGGCCCAGGCAGTCAGA 3'  
                  antisentido 5' GGCCTTTTGGGAAGGTTGGAT 3'

#### 12.- Análisis Estadístico

El análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS version 8. Los resultados se encuentran expresados como medianas y fueron analizados con la prueba de rangos señalados no paramétrica de Wilcoxon. Se consideró un valor significativo aquel que mostrara una  $p < 0.05$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN 27

## **Resultados**

### **AR42-J**

Las células fueron tratadas durante 6 h con los siguientes tóxicos: ETOH (35 mM), AC (50 $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml), ETOH (35 mM) + LPS (1  $\mu$ g/ml) y AC (50 $\mu$ M) + LPS (1  $\mu$ g/ml).

Las células tratadas con los diferentes tóxicos mostraron una viabilidad de alrededor del 90% determinada por la prueba de exclusión con Azul de Trípano, como se observa en la tabla 1.

Los niveles de amilasa secretados por las células durante el tratamiento con los tóxicos, se encontraron por debajo de las células control y la diferencia fue significativa con los tratamientos con ETOH, AC y LPS. Los tratamientos combinados no mostraron potenciación en los niveles de amilasa (tabla 1).

Los niveles de GSH obtenidos en los tratamientos con ETOH, AC y LPS mostraron valores disminuidos en un 10%, 17% y 16% respectivamente con respecto a las células control, alcanzando significancia estadística en los tratamientos con AC y LPS. Los tratamientos combinados con LPS, mostraron valores alrededor del presentado por los controles (12.7 y 14.2 nmol/L x millón de células) (tabla 1).

Al determinar el grado de lipoperoxidación encontramos que los valores obtenidos de MDA mostraron niveles iguales o ligeramente incrementados al mostrado por las células control, y sólo en el caso del tratamiento con ETOH+LPS observamos un incremento del 32%, mostrando una diferencia estadísticamente significativa (tabla 1).

### **Secreción de TNF- $\alpha$ e IL-6**

Las células AR42-J secretan TNF- $\alpha$  en condiciones basales. Cuando los cultivos se trataron con ETOH, AC y LPS mostraron una tendencia a incrementar en 1.9, 1.4 y 1.6 veces la secreción de TNF- $\alpha$  con respecto al de las células control. Sin embargo, estos valores no presentaron diferencia

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

estadísticamente significativa. En los tratamientos con ETOH+LPS y AC+LPS, los niveles de TNF- $\alpha$  secretados se encontraron cercanos a los mostrados por las células control (865 y 911 y 838 pg x millón de células respectivamente) como se observa en la tabla 2 y gráfica 1.

Las células no secretaron IL-6 de manera basal ni tampoco se vio inducida por los diferentes tratamientos (tabla 2).

#### Expresión del ARN mensajero de la PAP I y TNF- $\alpha$

Las células sin tratamiento presentaron de manera basal el ARNm de la PAP-1. Se observó un ligero incremento de la expresión de la PAP-I en las células tratadas con ETOH y AC (1.4 y 1.5 veces respectivamente), sin llegar a presentar una diferencia estadísticamente significativa. En el caso del tratamiento con LPS, se encontró un incremento estadísticamente significativo al compararlo con las células control. Cuando las células se trataron con ETOH y AC en combinación con el LPS, la expresión del mensajero de la PAP I mostró una tendencia a disminuir alcanzando valores cercanos al control. (tabla 3 y gráfica 2)

En cuanto a la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$ , las células lo presentaron de manera basal. Las células tratadas con ETOH y AC presentaron un incremento de 4 veces en la expresión del ARNm TNF- $\alpha$  y de 2 veces en las células tratadas con LPS con respecto a las células control. Mientras que en el tratamiento con ETOH+LPS, la expresión de TNF- $\alpha$  disminuyó por debajo del valor presentado por las células control y en el tratamiento con AC+LPS el incremento fue de 2 veces mayor a lo mostrado por las células control pero sin llegar a mostrar diferencia significativa. (tabla 3 y gráfica 3)

#### Capan-1

Las células Capan-1 también se sometieron a los mismos tratamientos con los tóxicos con los que fueron tratadas las células AR42-J.

La viabilidad mostrada por las células con los diferentes tratamientos fue superior al 90% determinado por azul de tripano (tabla 4).

Los niveles cuantificados de bicarbonato como producto de la actividad de la anhidrasa carbónica no sufrieron cambios como resultado de los tratamientos, presentando valores semejantes a los mostrados por las células control (tabla 4).

El nivel de GSH en los tratamientos con ETOH y AC+LPS fue muy semejante al mostrado por las células control (12.8nmol/L y 12.5nmol/L, respectivamente); en los casos de los tratamientos con LPS y ETOH+LPS el incremento fue de 1.1 y 1.3 veces más que el de las células control; y sólo en el caso del tratamiento con AC, el nivel se encontró disminuido en un 13% con respecto al valor mostrado por las células control ( $p=0.06$  Wilcoxon). Con ninguno de los tratamientos se observó una diferencia estadísticamente significativa. (tabla 4)

Los niveles de MDA en los tratamientos con ETOH, AC y LPS estuvieron ligeramente disminuidos con respecto a las células control (2.7 nmol/mg de proteína, 2.5 nmol MDA/mg de proteína y 2.9 nmol MDA/mg de proteína respectivamente vs. 3.2 nmol MDA/mg de proteína); en el caso de los tratamientos combinados (ETOH+LPS y AC+LPS) los niveles se incrementaron ligeramente con respecto a lo mostrado por las células control (tabla 4). No se observó una diferencia estadísticamente significativa con algún tratamiento.

#### Secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8

En cuanto a la secreción de citocinas por células Capan-1 tratadas con los diferentes tóxicos, no se encontró diferencia significativa entre los valores, únicamente se presentaron algunas tendencias. Las células Capan-1 presentaron una secreción basal de TNF- $\alpha$  y cuando fueron tratadas con ETOH, AC y LPS, los niveles aumentaron 1.6, 2 y 2.1 veces con respecto a las células control. Sin embargo cuando se hicieron las combinaciones de ETOH+LPS y AC+LPS, los niveles disminuyeron a los valores presentados por las células sin tratamiento (tabla 2 y gráfica 4).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En relación con la secreción de IL-6, en ningún caso se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Con respecto a IL-8, las células mostraron capacidad de secretarla a concentraciones nanomolares, y con los tratamientos se observó una tendencia a disminuir pero siempre con valores alrededor del presentado por las células control y sin diferencia estadística. (tabla 2 y gráfica 6)

#### Expresión del ARN mensajero de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8

Las células control expresaron de manera basal el ARNm de TNF- $\alpha$ . Los tratamientos con ETOH y AC no modificaron la expresión de TNF- $\alpha$ , mostrando valores semejantes a las células control. El tratamiento con LPS incrementó en 2 veces la expresión de TNF- $\alpha$  comparado con las células control. Cuando el tratamiento con ETOH se combinó con LPS, la expresión fue muy parecida a la que presentaron las células control; en el caso del tratamiento con AC+LPS se observó una tendencia a disminuir en un 50% con respecto a lo mostrado por las células control. Sin embargo, ningún tratamiento tuvo cambios con significancia estadística (tabla 5 y gráfico 7).

En el caso de la expresión del ARNm de IL-6, las células control presentaron un valor basal mayor al presentado por las células tratadas con los tóxicos. La disminución fue más evidente en el caso de las células tratadas con ETOH, AC y LPS. Pero en ningún tratamiento, ni independiente ni combinado, alcanzó significancia estadística (tabla 5 y gráfico 8).

En cuanto a la expresión del ARNm de IL-8, las células tratadas con ETOH y AC la expresión fue 50% menor a la presentada por las células control. La expresión de IL-8 en las células tratadas con LPS fue igual al de las células control y cuando las células fueron tratadas con ETOH+LPS, la expresión de esta citocina tendió a incrementarse 2 veces más con respecto a las células control; y cuando fueron tratadas con AC+LPS, la expresión disminuyó con respecto a las células control. Ningún tratamiento mostró diferencia estadísticamente significativa (tabla 5 y gráfica 9).

Tabla 1

Actividad de la Amilasa y contenido de Glutacion reducido y Malondialdehido en células AR42-J

|                       | n  | Control             | Etanol             | Acetaldehído        | LPS                 | Etanol+LPS         | Acetaldehído+LPS   |
|-----------------------|----|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| Viabilidad (%)        | 13 | 91<br>(81-100)      | 94<br>(87-98)      | 90<br>(79-95)       | 90<br>(75-97)       | 95<br>(89-100)     | 96<br>(75-97)      |
| Amilasa (mU)*         | 12 | 2.4<br>(0.78-6.9)   | 2.2*<br>(0.72-6.2) | 2.3*<br>(0.85-5.7)  | 2.2*<br>(0.8-6.8)   | 2.5<br>(1.3-4.2)   | 2.6<br>(1.4-4.7)   |
| GSH<br>(nmol/L)*      | 7  | 12.2<br>(10.2-17.2) | 10.9**<br>(9.4-14) | 10.1*<br>(7.9-12.2) | 10.2*<br>(8.8-16.4) | 12.7<br>(6.6-21.1) | 14.2<br>(6.7-22.0) |
| MDA<br>(nmol/mg prot) | 6  | 2.65<br>(1.9-5.6)   | 2.9<br>(2.2-4.3)   | 2.9<br>(2.2-5.9)    | 3.5<br>(2.5-5.0)    | 3.5*<br>(2.3-5.9)  | 3.3<br>(2.0-5.4)   |

\*En  $1 \times 10^6$  células; \*P<.05; P\*\*=0.063

Las células fueron tratadas durante 6 horas con Etanol (35 mM), Acetaldehído (50  $\mu$ M) o Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml), Etanol (35 mM) más Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml) o Acetaldehído (50  $\mu$ M) más Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml); terminado el tiempo de incubación se procedió a realizar las determinaciones señaladas en la sección de material y métodos. Los datos se encuentran expresados en medianas. Abreviaturas: GSH= glutatión reducido; MDA= malondialdehído; LPS= lipopolisacárido

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Tabla 2**  
**Secreción de Citocinas**

| AR42-J          |   |                     |                                  |                                 |                                  |                     |                     |
|-----------------|---|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------|---------------------|
|                 | n | Control             | Etanol                           | Acetaldehído                    | Lipopolisacárido                 | Etanol+LPS          | Acetaldehído+LPS    |
| TNF- $\alpha$ * | 4 | 838<br>(696-884)    | 1639 <sup>a</sup><br>(1444-2711) | 1187 <sup>a</sup><br>(773-1448) | 1390 <sup>a</sup><br>(1112-2013) | 865<br>(854-872)    | 911<br>(786-914.3)  |
| IL-6*           | 4 | 0                   | 0                                | 0                               | 0                                | 0                   | 0                   |
| Capan-1         |   |                     |                                  |                                 |                                  |                     |                     |
| TNF- $\alpha$ * | 3 | 906<br>(560-1662)   | 1484<br>(961-2500)               | 1865<br>(1399-1886)             | 1902<br>(1317-3471)              | 1039<br>(947-1068)  | 953<br>(931-1011)   |
| IL-6*           | 4 | 39<br>(29-80)       | 46<br>(32-61)                    | 51<br>(25-70)                   | 38<br>(31-70)                    | 29<br>(17-56)       | 44<br>(34-72)       |
| IL-8*           | 4 | 4526<br>(3302-5711) | 3465<br>(2788-4686)              | 4171<br>(3389-4762)             | 3590<br>(3306-4549)              | 3535<br>(2966-5053) | 3717<br>(3315-5037) |

\*pg x millón de células; \*P= 0.068 Wilcoxon

Las células AR42-J y Capan-1 fueron tratadas durante 6 horas con Etanol (35mM), Acetaldehído (50 $\mu$ M), Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml) o las combinaciones de Etanol (35mM) más Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml) o Acetaldehído (50 $\mu$ M) más Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml); al finalizar el tiempo de incubación se procedió a realizar las determinaciones de las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 para rata en células AR42-J y de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 humanas para las células Capan-1 en los sobrenadantes celulares, como se señala en la sección de material y métodos. Los datos se encuentran expresados en medianas. Abreviaturas: LPS= lipopolisacárido; TNF- $\alpha$  = Factor de necrosis tumoral alfa; IL-6 = Interleucina 6; IL-8 = Interleucina 8.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 3

Expresión del ARNm de PAP-I y TNF- $\alpha$  en la línea celular AR42-J

|                                   | n | Control           | Etanol             | Acetaldehído      | Lipopolisacárido   | Etanol+LPS         | Acetaldehído+LPS   |
|-----------------------------------|---|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| PAP/ $\beta$ -Actina<br>(píxeles) | 5 | 0.61<br>(0.5-2.2) | 0.83<br>(0.5-1.8)  | 0.7<br>(0.5-3.3)  | 1.08*<br>(0.5-3.8) | 0.93<br>(0.7-2.1)  | 0.94<br>(0.6-3.3)  |
| TNF- $\alpha$<br>(pg/ $\mu$ l)    | 5 | 1.46<br>(1.4-5.5) | 5.85<br>(2.9-11.7) | 5.85<br>(1.4-5.8) | 2.92<br>(0.7-5.85) | 0.73<br>(0.3-11.7) | 2.92<br>(0.7-11.7) |

\*P=<0.05 Wilcoxon

Las células fueron tratadas durante 6 horas con Etanol (35 mM), Acetaldehído (50 $\mu$ M), Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml), Etanol (35 mM) más Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml) o Acetaldehído (50 $\mu$ M) más Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml), terminado el tratamiento se procedió a extraer el ARN total según la técnica de Chomczyynski y Sacchi y por RT-PCR se midió de manera semicuantitativa la expresión del ARNm con iniciadores específicos para PAP I,  $\beta$ -Actina y TNF- $\alpha$

TESTES CON  
 FALLA DE ORIGEN



Tabla 4

Actividad de la Anhidrasa Carbónica y contenido de Glutation reducido y Malondialdehído en células Capan-1

|                             | n | Control             | Etanol              | Acetaldehído                    | LPS                 | Etanol + LPS        | Acetaldehído+LPS    |
|-----------------------------|---|---------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Viabilidad (%)              | 7 | 92<br>(87-96)       | 92<br>(88-98)       | 91<br>(83-96)                   | 93<br>(83-99)       | 91<br>(88-97)       | 94<br>(90-98)       |
| Anhidrasa Carbónica (mM/L)* | 7 | 11.8<br>(11.1-12.6) | 11.9<br>(10.4-12.9) | 11.8<br>(11.0-12.4)             | 11.9<br>(11.3-12.6) | 11.5<br>(11.1-12.2) | 11.8<br>(11.4-12.3) |
| GSH (nmol/L)*               | 4 | 12.3<br>(9.4-30.8)  | 12.8<br>(8.4-22.8)  | 10.8 <sup>a</sup><br>(5.3-24.7) | 14.1<br>(10.9-32.9) | 16<br>(14.3-26.5)   | 12.5<br>(11.6-23.3) |
| MDA (nmol/mg de prot.)      | 4 | 3.2<br>(2.7-4.8)    | 2.7<br>(1.4-5.2)    | 2.5<br>(2.5-4.5)                | 2.9<br>(1.8-5.0)    | 3.5<br>(1.6-4.2)    | 3.4<br>(1.6-4.2)    |

\*1 x 10<sup>6</sup> células; <sup>a</sup>P=0.06 (Wilcoxon)

Las células fueron tratadas durante 6 horas con Etanol (35 mM), Acetaldehído (50 µM) o Lipopolisacárido (1 µg/ml) o las combinaciones de Etanol (35 mM) más Lipopolisacárido (1 µg/ml) o Acetaldehído (50 µM) más Lipopolisacárido (1 µg/ml); terminado dicho tratamiento se procedió a realizar las determinaciones señaladas en la sección de material y métodos. Los datos se encuentran expresados en medianas. Abreviaturas: LPS= lipopolisacárido; GSH= glutatión reducido; MDA= Malondialdehído

TRABAJO CON  
 FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

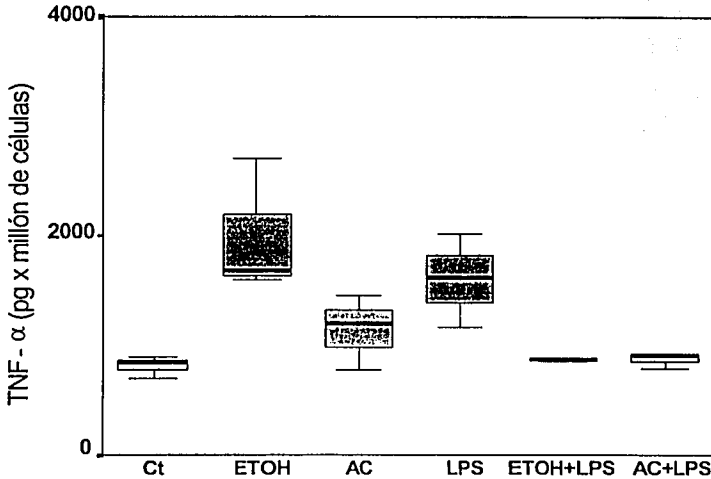
**Tabla 5**

**Expresión del ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en la línea celular Capan--1**

|                                | n | Control            | Etanol              | Acetaldehído        | Lipopolisacárido    | Etanol+LPS          | Acetaldehído+LPS    |
|--------------------------------|---|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| TNF- $\alpha$<br>(pg/ $\mu$ l) | 3 | 2.92<br>(5.8-1.4)  | 2.92<br>(1.4-2.9)   | 2.92<br>(2.9-5.8)   | 5.85<br>(2.9-11.7)  | 2.92<br>(2.9-1.4)   | 1.46<br>(0.7-2.92)  |
| IL-6<br>(pg/ $\mu$ l)          | 3 | 1.46<br>(0.09-2.9) | 0.18<br>(0.09-0.18) | 0.04<br>(0.01-0.09) | 0.09<br>(0.04-0.73) | 0.36<br>(0.04-0.73) | 0.35<br>(0.04-0.73) |
| IL-8<br>(pg/ $\mu$ l)          | 3 | 2.92<br>(0)        | 1.46<br>(1.46-2.92) | 1.46<br>(0.36-2.92) | 2.92<br>(1.46-5.85) | 5.85<br>(2.92-5.85) | 0.73<br>(0.36-2.92) |

Las células fueron tratadas durante 6 horas con Etanol (35 mM), Acetaldehído (50 $\mu$ M), Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml), Etanol (35 mM) más Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml) o Acetaldehído (50 $\mu$ M) más Lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml), terminado el tratamiento se procedió a extraer el ARN total según la técnica de Chomczynski y Sacchi y por RT-PCR se midió la expresión del ARNm con iniciadores específicos para TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 humanos. Los datos se encuentran expresados en medianas. Abreviaturas: TNF- $\alpha$  = Factor de necrosis tumoral alfa; IL-6 = Interleucina 6; IL-8 = Interleucina 8; RT-PCR = Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa; LPS = lipopolisacárido.

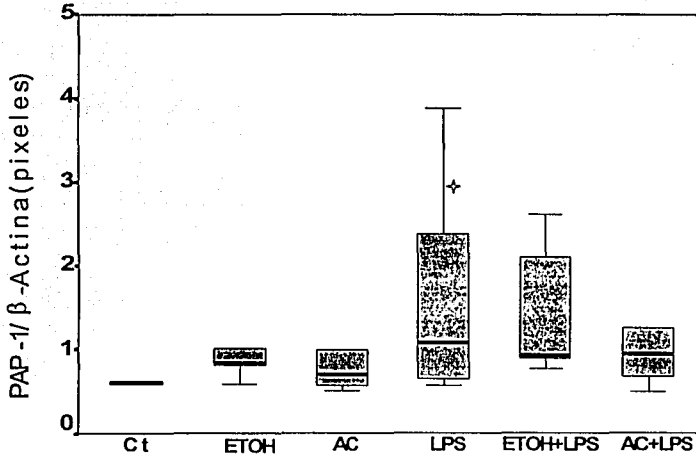
## AR42-J



Gráfica 1. Secreción de TNF- $\alpha$  por las células AR42-J después de 6 horas de tratamiento con ETOH (35 mM), AC (50  $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml), ETOH (35 mM) +LPS (1  $\mu$ g/ml) y AC (50  $\mu$ M) + LPS (1  $\mu$ g/ml). Abreviatura: Ct= control; ETOH= etanol; AC= acetaldehído; LPS= lipopolisacárido; ETOH+LPS= etanol+lipopolisacárido; AC+LPS= acetaldehído+lipopolisacárido; TNF- $\alpha$ = Factor de necrosis tumoral alfa. Los experimentos se realizaron 4 veces de manera independiente y por duplicado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AR42-J



Gráfica 2.- Expresión del ARNm de la PAP-1 en las células AR42-J después de 6 h de tratamiento con ETOH (35 mM), AC (50  $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml), ETOH (35 mM) +LPS (1  $\mu$ g/ml) y AC (50  $\mu$ M) + LPS (1  $\mu$ g/ml). Los experimentos fueron realizados 5 veces. Abreviatura: Ct= control; ETOH= etanol; AC= acetaldehído; LPS= lipopolisacárido; ETOH+LPS= etanol+lipopolisacárido; AC+LPS= acetaldehído+lipopolisacárido; PAP-1= Proteína Asociada a la pancreatitis 1.

✦ P<0.05

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### AR42-J

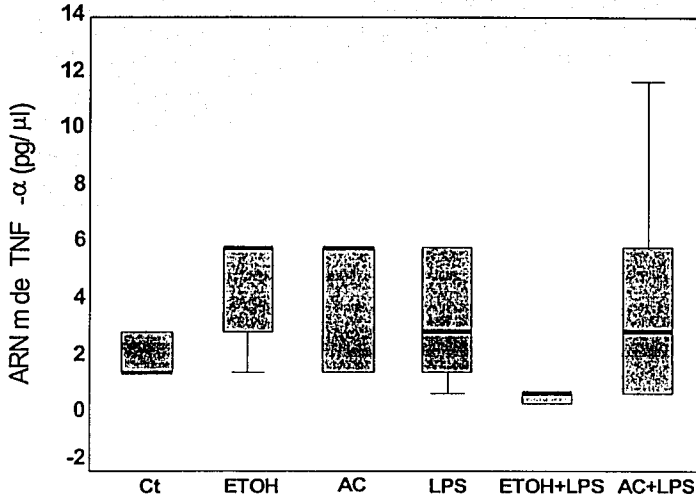
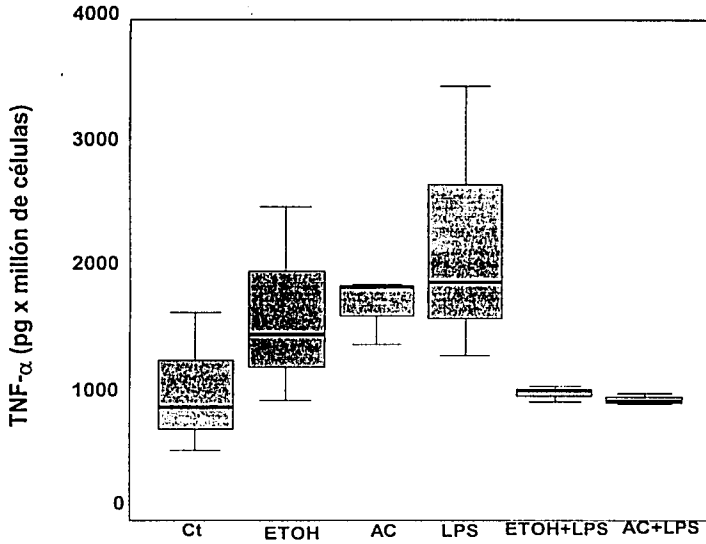


Gráfico 3.- Expresión del ARNm de TNF- $\alpha$  en las células AR42-J después de 6 h de tratamiento con ETOH (35 mM), AC (50  $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml), ETOH (35 mM) +LPS (1  $\mu$ g/ml) y AC (50  $\mu$ M) + LPS (1  $\mu$ g/ml). Los experimentos se realizaron 5 veces. Abreviatura: Ct= control; ETOH= etanol; AC= acetaldehído; LPS= lipopolisacárido; ETOH+LPS=etanol+lipopolisacárido; AC+LPS= acetaldehído+lipopolisacárido; TNF- $\alpha$ = Factor de necrosis tumora alfa.

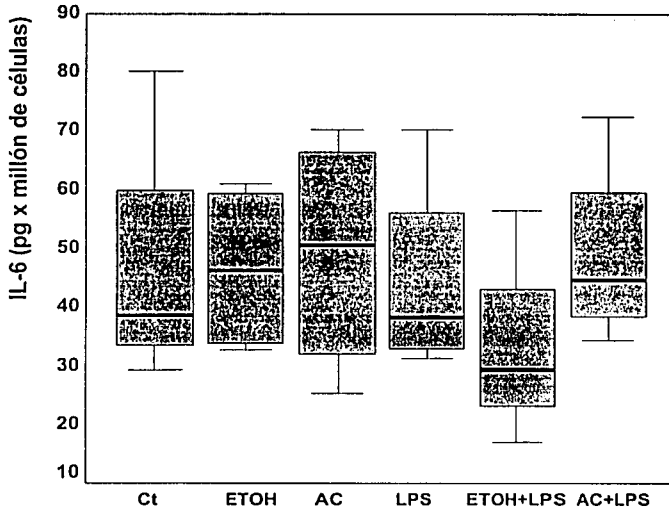
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Capan-1



Gráfica 4.- Secreción de TNF- $\alpha$  por las células Capan-1 después de 6 horas de tratamiento con ETOH (35 mM), AC (50  $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml), ETOH (35 mM) +LPS (1  $\mu$ g/ml) y AC (50  $\mu$ M) + LPS (1  $\mu$ g/ml). Los experimentos se realizaron 4 veces de manera independiente y por duplicado. Abreviaturas: Ct=control; ETOH=etanol; AC=acetaldehído; LPS= lipopolisacárido; ETOH+LPS = etanol más lipopolisacárido; AC+LPS = acetaldehído más lipopolisacárido; TNF- $\alpha$ = Factor de necrosis tumoral alfa.

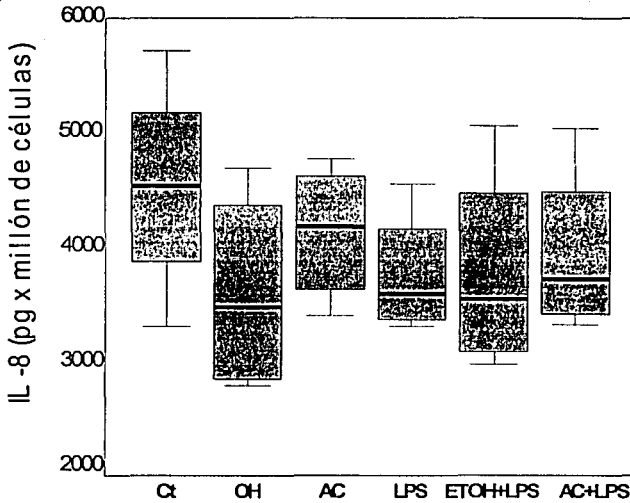
## Capan-1



Gráfica 5. Efecto en la secreción de IL-6 en las células Capan-1 después de 6 horas de tratamiento con ETOH (35 mM), AC (50  $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml), ETOH (35 mM) +LPS (1  $\mu$ g/ml) y AC (50  $\mu$ M) + LPS (1  $\mu$ g/ml). Los experimentos se realizaron 4 veces y cada uno por duplicado. Abreviaturas: Ct=control; ETOH=etanol; AC=acetaldehído; LPS= lipopolisacárido; ETOH+LPS = etanol más lipopolisacárido; AC+LPS = acetaldehído más lipopolisacárido; IL-6= Interleucina 6

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Capan-1



Gráfica 6. Efecto de la secreción de IL-8 en las células Capan-1 después de 6 horas de tratamiento con ETOH (35 mM), AC (50  $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml), ETOH (35 mM) +LPS (1  $\mu$ g/ml) y AC (50  $\mu$ M) + LPS (1  $\mu$ g/ml). Los experimentos se realizaron 4 veces y cada uno por duplicado. Abreviaturas: Ct=control; ETOH=etanol; AC=acetaldéhid; LPS= lipopolisacárido; ETOH+LPS = etanol más lipopolisacárido; AC+LPS = acetaldéhid más lipopolisacárido; IL-8= Interleucina 8.



## Capan-1

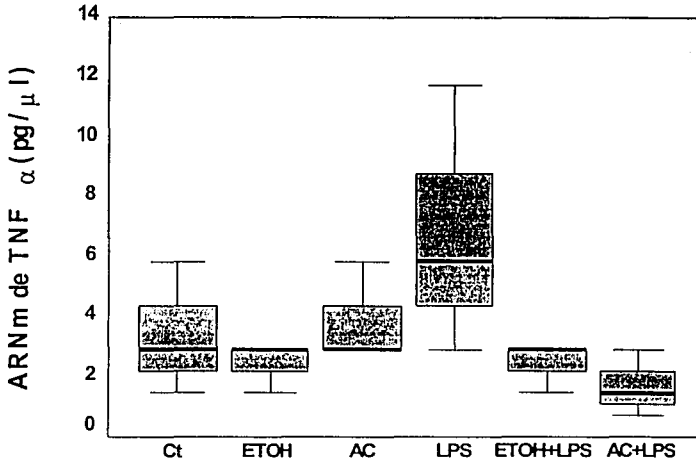


Gráfico 7.- Expresión del ARNm de TNF- $\alpha$  en las células Capan-1 después de 6 h de tratamiento con ETOH (35 mM), AC (50  $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml), ETOH (35 mM) +LPS (1  $\mu$ g/ml) y AC (50  $\mu$ M) + LPS (1  $\mu$ g/ml). Los experimentos se realizaron por duplicado de manera independiente 3 veces. Abreviaturas: Ct=control; ETOH=etanol; AC=acetaldehído; LPS= lipopolisacárido; ETOH+LPS = etanol más lipopolisacárido; AC+LPS = acetaldehído más lipopolisacárido; TNF- $\alpha$ = Factor de necrosis tumoral alfa.

## Capan-1

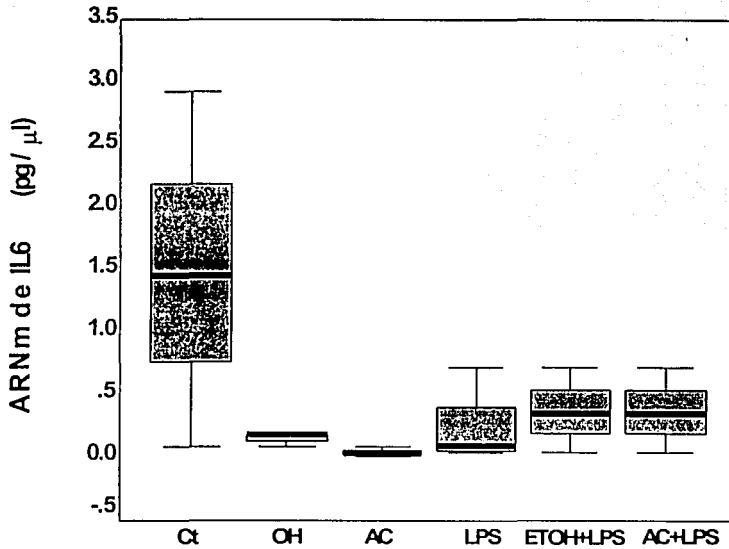


Gráfico 8.- Expresión del ARNm de IL-6 en las células Capan-1 después de 6 h de tratamiento con ETOH (35 mM), AC (50  $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml), ETOH (35 mM) +LPS (1  $\mu$ g/ml) y AC (50  $\mu$ M) + LPS (1  $\mu$ g/ml). Los experimentos se realizaron por duplicado 3 veces. Abreviaturas: Ct=control; ETOH=etanol; AC=acetaldehído; LPS= lipopolisacárido; ETOH+LPS = etanol más lipopolisacárido; AC+LPS = acetaldehído más lipopolisacárido; IL-6= Interleucina 6

## Capan-1

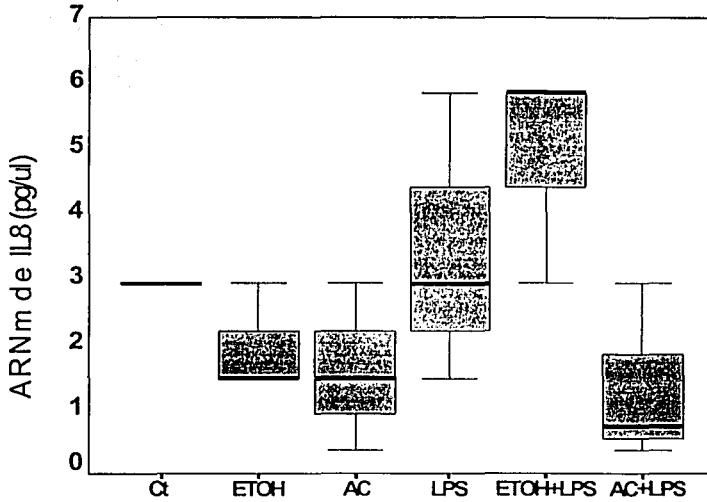
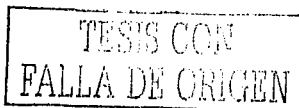


Gráfico 9.- Expresión del ARNm de IL-8 en las células Capan-1 después de 6 h de tratamiento con etanol 35 mM (ETOH), acetaldehído 50  $\mu$ M (AC), lipopolisacárido 1  $\mu$ g/ml (LPS), etanol 35 mM + lipopolisacárido 1  $\mu$ g/ml (ETOH+LPS) y acetaldehído 50  $\mu$ M + lipopolisacárido (1  $\mu$ g/ml) (AC+LPS). Los experimentos se realizaron 3 veces por duplicado. Abreviatura: Ct= control; ETOH=etanol; AC=acetaldehído; LPS= lipopolisacárido; ETOH+LPS= etanol más lipopolisacárido; AC+LPS = acetaldehído más lipopolisacárido; IL-8= Interleucina 8.

## Discusión

En el presente estudio, utilizamos dos líneas celulares que representan al páncreas exocrino como las células acinares (AR42-J) y las células ductales (Capan-1) como modelo para evaluar el efecto directo del alcohol, acetaldehído y/o lipopolisacárido en la secreción y expresión de citocinas pro-inflamatorias y algunos marcadores de daño celular. Este modelo, nos permitió eliminar los efectos hormonales y nutricionales, además de todos los mecanismos de homeostasis que nos presenta un modelo *in vivo*.

Dado que el objetivo consistió en evaluar el efecto tóxico de cada uno de los productos probados, se consideró importante que las células presentaran una viabilidad alta en presencia de los agentes tóxicos. Además, se consideró importante que las concentraciones utilizadas tuvieran relevancia clínica. En base a lo anterior, se consideró utilizar alcohol 35 mM, concentración utilizada por otros investigadores (Lu y col. 2002), la cual representa el valor encontrado en sangre de bebedores moderados (Haber y col. 1991, Mandrekar y col. 1999). En el caso del AC, la concentración utilizada fue de 50  $\mu$ M, valor medio de lo reportado en el suero de individuos sanos sometidos a pruebas de ingestión moderada de alcohol, cuyo rango varía de 10  $\mu$ M - 100  $\mu$ M (Stowell y col. 1980) y en algunos casos en sujetos con abuso de alcohol, los valores plasmáticos alcanzan una concentración de 525  $\mu$ M (Watanabe y col. 1985). Por otro lado, He Z y col. (2001) reportaron que con valores de AC de entre 30  $\mu$ M y 40  $\mu$ M en tejido pancreático de rata, las células acinares presentaron una disminución de los gránulos de zimógeno junto con la formación de vacuolas intra citoplasmáticas. La concentración de LPS, se basó en la utilizada en diversos artículos, tanto en líneas celulares pancreáticas, como es el caso de las células Capan-1 y Capan-2 (Blanchard y col. 2000), como en células mononucleares y monocitos (Mandrekar y col. 1999). Las concentraciones reportadas van de 0.1 hasta 20  $\mu$ g/ml. En las células AR42-J se observa respuesta celular a concentraciones de LPS que van de 1 ng/ml hasta 100  $\mu$ g/ml (Vaaccaro y col. 2000). Así, la concentración escogida en el presente estudio fue de 1  $\mu$ g/ml. Se verificó la viabilidad celular con las concentraciones elegidas encontrando que tanto la línea celular Capan-1



como las AR42-J mostraron una viabilidad alrededor del 90% cuando se trataron con los tóxicos en forma individual y combinada.

El tiempo de tratamiento fue de 6 h, tiempo que se consideró adecuado para conocer la respuesta aguda de la célula a los tóxicos. Existen estudios experimentales, con líneas celulares o con cultivo de *acinis* primarios, en los que se ha observado que a las 6 h se inicia la respuesta celular siendo en algunos casos, la respuesta máxima en este tiempo. Por ejemplo, la expresión de proteínas de fase aguda (Vaccaro y col. 2000), de citocinas (Norman y col. 1997), de factores de transcripción (Hietaranta y col. 2001), de secreción de enzimas pancreáticas (Denham y col. 1998) o el incremento del daño oxidativo como en el caso del modelo experimental de pancreatitis aguda en ratas usando taurocolato de sodio (Kruse y col. 2001), se manifiestan a este tiempo.

Se ha encontrado que pacientes con pancreatitis aguda sufren de endotoxemia y que el nivel de endotoxina correlaciona con la severidad de la enfermedad (Beaux y col. 1996). Se considera que el alcohol podría favorecer la traslocación bacteriana alterando la permeabilidad del tracto gastrointestinal (Robles Díaz y col. 1997, Fortunato y col. 2000). Debido a lo anteriormente expuesto, nosotros decidimos exponer a las células al ETOH, AC y LPS en forma independiente y combinada.

Se ha reportado que las líneas celulares pierden la capacidad de oxidar el alcohol (Le Petit-Thevenin y col. 1998). Por lo tanto, los resultados obtenidos con estos tratamientos son producto del efecto *per se* del ETOH, y/o AC sobre las líneas celulares.

En las células de origen acinar, AR42-J, al medir en los sobrenadantes celulares la secreción de amilasa, observamos que hubo una disminución significativa en la secreción con ETOH, AC, LPS y ETOH+LPS, datos que nos hablarían de compromiso en la integridad funcional de la célula a pesar de presentar una alta viabilidad celular. En las células de origen ductal Capan-1, la actividad de la anhidrasa carbónica no mostró algún cambio con los tratamientos. Estos resultados nos

Indican que las concentraciones utilizadas no afectaron de manera importante la funcionalidad celular.

En cuanto a los marcadores de daño celular que nos indican alteraciones en el nivel oxidativo de las células, observamos que en el caso de las células AR42-J, el GSH disminuyó significativamente con los tratamientos con AC y LPS y sólo mostró una tendencia ( $p = 0.063$ ) a disminuir con alcohol. Los valores del daño lipoperoxidativo, determinado por generación de MDA, muestran que sólo en el tratamiento con ETOH+LPS se observa un incremento significativo del parámetro, lo que nos hablaría de que no existe generación de radicales libres. Considerando que no hubo metabolismo celular del alcohol, estos resultados son consecuencia del efecto directo y por sí mismo del ETOH, AC, LPS y ETOH+LPS. Se ha reportado que en los *acinis* pancreáticos, los niveles disminuidos de GSH podrían interferir en los procesos de secreción y que por lo tanto el GSH juega un papel importante en el bloqueo de la secreción celular de enzimas observada al inicio de la pancreatitis aguda (Yu y col. 2002). Por otra parte, cuando en forma normal la célula produce radicales libres a nivel mitocondrial, la célula cuenta con sistemas antioxidantes capaces de contrarrestarlos y, aún si existiera otro tipo de radicales libres, estos mismos sistemas entrarían en acción ya que la célula durante los tratamientos mantuvo un alto nivel de viabilidad.

Los resultados obtenidos en la secreción de amilasa por las células AR42-J, probablemente se relacionen con un proceso alterado en la secreción de proteínas de la célula acinar debido al daño producido por el tóxico. La disminución en los niveles de GSH indica que la capacidad protectora de la célula está abatida a las 6 h de tratamiento. Sin embargo, es importante señalar que el páncreas humano después del hígado, riñón e intestino delgado es el órgano que tiene la cuarta concentración más alta de GSH (Neuschwander-Tetri y col. 1997, Walling MA 1998) y que también es capaz de sintetizar GSH (Neuschwander-Tetri y col. 1997). En particular, este mismo grupo observó que en los *acinis* pancreáticos, las enzimas claves en la síntesis de GSH son capaces de responder en forma dinámica a condiciones patológicas, sugiriendo que el GSH tiene una función protectora (Neushawander-Tetri y col. 1997). También es de llamar la atención, que la línea celular

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

más sensible a los tóxicos fueron las células acinares. La principal función de las células acinares es la síntesis y secreción de enzimas digestivas. Este proceso requiere la formación de enlaces disulfuro para la formación de las nuevas proteínas, por lo tanto se requiere del transporte continuo de GSH al retículo endoplásmico para establecer el ambiente redox apropiado para la formación de los enlaces disulfuro (Hwang y col. 1992). Los resultados obtenidos en nuestro estudio, es decir, niveles disminuidos de amilasa y GSH, podrían ser explicados por este proceso.

En cuanto a las células Capan-1, sólo el tratamiento con AC mostró una tendencia a disminuir el nivel de GSH, pero los niveles de MDA se mostraron bajos, es decir, tampoco hubo generación de radicales libres, datos que apoyarían que bajo el diseño experimental del presente trabajo, las células Capan-1 no sufrieron daño.

En cuanto a la expresión de la PAP-1 en las células acinares, se observa que en los tratamientos con ETOH y AC los valores se encontraron muy cercanos a los presentados por las células control, y sólo en el caso del LPS se observó un incremento que alcanzó significancia estadística. Iovanna y col (1991) encontraron que el consumo crónico de alcohol en ratas indujo la PAP-1, y Vaccaro MI y col (2000) informaron que tanto *in vivo* como *in vitro*, el tratamiento con LPS también era capaz de inducirla, encontrando que la máxima expresión ocurría a las 18 h. Por otro lado, no hay antecedentes de inducción de esta proteína por las células acinares cuando se exponen al AC. En conclusión, tenemos evidencia de que 6 horas después de que la línea celular AR42-J se trata con LPS, incrementa la expresión de PAP-1, mientras que el incremento en su expresión no fue significativo con el tratamiento con ETOH o AC. Sin embargo, con estos últimos resultados no se puede descartar que las células respondan a la agresión del alcohol y su metabolito en forma más tardía, tal como se ha informado en los resultados previos antes mencionados.

Cuando las células AR42-J fueron expuestas a tratamientos combinados ETOH+LPS y AC+LPS, la expresión de la PAP-1 aunque mantuvo valores muy cercanos a los presentados en el tratamiento con LPS, no alcanzó diferencia significativa con respecto al control. Estos resultados sugieren que el LPS a las concentraciones utilizadas fue el tóxico capaz de inducir mayor daño a la célula acinar

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

y que esta capacidad parece atenuarse al combinarse con ETOH o AC. Nosotros esperábamos que con los tratamientos combinados el LPS incrementara o potenciara el daño, los resultados nos demuestran que no fue así, y una posible explicación podría ser la ausencia en las líneas celulares del metabolismo de ETOH y al no existir una sobreproducción de radicales libres no se incrementa el daño producido por el LPS. Aunque por otra parte, se ha reportado que no es necesario el metabolismo del alcohol vía deshidrogenasa alcohólica en macrófagos de alveolo pulmonar de rata para inhibir la transcripción de la óxido nítrico sintetasa y síntesis de TNF- $\alpha$  estimulada con LPS. (Greenberg y col. 1999). Otra explicación, aunque muy remota, sería la probable reacción química del alcohol y acetaldehído con el LPS. Se ha informado, en métodos de detoxificación con aglomerados de enterobacterias una degradación del LPS por acción del alcohol pero bajo condiciones básicas ( Domelsmith y col. 1990) sin embargo, esta posible degradación no podría darse *in vivo* en nuestros cultivos celulares debido a que se mantiene un pH fisiológico.

Otro de los puntos a estudiar en estas líneas celulares, fue el conocer la respuesta inflamatoria a través de la secreción y expresión de citocinas proinflamatorias.

En las células AR42-J se determinó la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6 así como la expresión de TNF- $\alpha$ . Las células AR42-J fueron capaces de secretar TNF- $\alpha$ , ya que antes se había reportado que *acinis* pancreáticos aislados de ratas con pancreatitis aguda inducida con ceruleína y *acinis* de ratas control, eran capaces de producir, secretar y responder a TNF- $\alpha$ , y que al ser estimuladas durante 3 y 6 h con 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS la secreción de TNF- $\alpha$  no aumentaba (Gukovskaya y col. 1997). Nuestras células en condiciones basales secretaron TNF- $\alpha$  y cuando fueron expuestas al ETOH, AC y LPS se observó una tendencia a incrementarse 2, 1.4 y 1.6 veces respectivamente, situación que también se observó en la expresión de TNF- $\alpha$  en los tratamientos con ETOH, AC y LPS, en los que el incremento fue de 4, 4 y 2 veces respectivamente; este incremento producido por ETOH y AC desaparece al combinarse con LPS. Incluso el tratamiento con ETOH+LPS, llevó a menor expresión de TNF- $\alpha$ ; aún cuando en ningún caso el cambio fue significativo pareciera que la célula fue capaz de responder a la agresión provocada por el tratamiento con los tóxicos en forma

TESTES CON  
FALLA DE ORIGEN



Individual. Probablemente el tiempo de exposición jugó un papel importante para que no se alcanzara diferencia estadística. Con relación a la secreción de IL-6, ésta no se secretó ni en forma basal ni bajo ningún tóxico ya sea en forma independiente o combinada. Algunos investigadores han observado en modelos experimentales, que la producción intra-pancreática de IL-1 y TNF- $\alpha$  están incrementadas en etapas tempranas de la pancreatitis aguda, mientras que la IL-6 es producida en el páncreas después de que la pancreatitis se ha desarrollado (Kim y col. 2000, Norman y col- 1997) y que el retardo en la expresión del ARNm de IL-6 va de acuerdo con el patrón observado en la elevación tardía de IL-6 en el suero de pacientes con pancreatitis aguda y modelos experimentales (Norman y col. 1997). En nuestro estudio, es probable que el tiempo de exposición no haya sido el suficiente para que se activaran los factores de transcripción necesarios para la producción de IL-6 en respuesta a los tóxicos, pero también puede esperarse que esta producción no ocurriera en células acinares y que la IL-6 en el parénquima pancreático sea originado en otras células, como las ductales o inflamatorias.

En las células Capan-1, la secreción de TNF- $\alpha$  mostró un incremento en los tratamientos con ETOH, AC y LPS con respecto a las células control. En los tratamientos combinados la secreción de TNF- $\alpha$  mostró valores muy parecidos a los presentados a las células control. La expresión de TNF- $\alpha$ , se incrementó sólo en el tratamiento con LPS y la expresión disminuyó en el tratamiento con AC+LPS con respecto a las células control. Ni en la secreción ni en la expresión de TNF- $\alpha$  se observó diferencia estadística.

En cuanto a la secreción de IL-6 e IL-8 en las células Capan-1, no se observaron cambios importantes. Nuestros resultados confirman que estas células son capaces de secretar IL-6 e IL-8. Blanchard y col. (2000) reportaron que las células Capan-1 eran capaces de responder a la endotoxina a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  y un tiempo de incubación de 24 h al incrementar la secreción de IL-6. Nosotros utilizamos una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  y un tiempo de incubación de 6 h; probablemente tanto la dosis como el tiempo de incubación marquen la diferencia en la respuesta de secreción de IL-6. La expresión del ARNm de IL-6 mostró valores por debajo de lo

expresado por las células control, y es muy probable que no se hayan activado factores de transcripción que incrementaran la expresión de IL-6 debido a las concentraciones usadas. También es importante recordar que en la cascada de citocinas, la IL-6 se incrementa después de la activación de TNF- $\alpha$ , y dado la baja respuesta de esta citocina en nuestros experimentos, es esperado que la expresión de IL-6 no se incrementara.

En cuanto a los niveles de secreción de IL-8 en las células Capan-1, se observaron valores muy altos en todas las condiciones experimentales, pero ligeramente menores con respecto a las células control. Los valores muy altos en las células control son semejantes a los reportados por el grupo de Blanchard y col. (2000) y Takamori y col. (2000). Es interesante hacer notar, que la producción de IL-8 no aumentó con ninguno de los tratamientos. Blanchard y col. (2000) reportaron un incremento en la secreción de IL-8 a concentraciones más altas de LPS que las utilizadas en el presente trabajo, además de que su tiempo de incubación fue de 24 h. Con respecto a la expresión de IL-8, sólo se observó un incremento no significativo estadísticamente en la expresión de esta citocina en el tratamiento con ETOH+LPS.

Los resultados muestran que el LPS en ambas líneas celulares no tuvo efecto aditivo al daño producido por el ETOH y el AC. Más aún, algunos datos sugieren que el LPS atenúa el efecto del ETOH y AC o que éstos últimos neutralicen el potencial tóxico del LPS. Estos resultados nos indican que existe otra vez una respuesta de la célula a estos tóxicos y que de acuerdo a lo informado por otros investigadores, el tiempo de incubación pudo jugar un papel importante para que no se alcanzara significancia estadística. Los cambios tempranos observados *in vivo* pueden ser más acentuados por la contribución de otras células, como la de los leucocitos durante la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, la participación del LPS desde el inicio de la exposición de las células pancreáticas al ETOH o al AC, no magnifica su efecto sino incluso parece atenuarlo. Existen reportes en la literatura, que demuestran un efecto protector del LPS, por ejemplo en un modelo de pancreatitis

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

inducida con ceruleína, donde observaron que la expresión de la PAP-1 se incrementó, acompañado de cambios histológicos y niveles elevados de amilasa en suero. Cuando sólo se inyectó LPS, la expresión de la PAP-1 aumento 18 veces con respecto al anterior sin observarse cambios importantes en los niveles séricos de amilasa, así como tampoco cambios importantes al nivel histológico pero sí de una respuesta elevada y sostenida en los niveles de expresión del ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IFN- $\gamma$ . Cuando se realizó la combinación ceruleína+LPS, la expresión de PAP-1 no aumentó más, aunque sí hubo cambios importantes en la histología del tejido pancreático y en los niveles de amilasa sérica, resultado que los llevó a sugerir que la expresión de la PAP-1 podría ser modulada por el LPS (Wang y col. 2001). Otro grupo, encontró que en un modelo de pancreatitis aguda inducida con ceruleína, dosis bajas de LPS (1  $\mu$ g/ml) protegían al páncreas contra el daño agudo y que el efecto protector del LPS se debía en parte a un incremento en la generación del óxido nítrico pancreático (Jaworek y col. 2001). En otro estudio también se propuso que el LPS disminula el daño en tejido pancreático a través de la activación de la superóxido dismutasa (Abe y col.1995) y otro grupo observó apoptosis con dosis bajas de LPS en un modelo experimental de pancreatitis aguda inducido con ceruleína (Kimura y col. 1998). En nuestro estudio no observamos estrés oxidativo, lo que nos lleva a suponer que el daño producido por el LPS no se incrementó con los tratamientos combinados, pero cuando se administró en forma independiente, el daño fue más evidente sobre todo en las células AR42-J. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual éstas células responden al LPS, se ha reportado que células que no expresan el receptor CD14 son capaces de responder al LPS, como la línea celular LLC-PK (células del epitelio tubular renal) y túbulos renales aislados (Mayeux y col. 1993, Proksch y col. 1996). Se ha informado que existen 2 tipos de receptores CD14, el soluble (CD14s) y el membranar (CD14m). El primero se encuentra en el suero y el segundo está presente en células de origen mielóide, así se ha reportado que células que no expresan CD14m, por ejemplo células endoteliales y epiteliales, son capaces de responder en presencia de CD14s a bajas concentraciones de LPS. Una proteína importante que se encuentra en el suero y que facilita la interacción del LPS con el receptor CD14 es la LBP (LPS-binding protein). Nakatani y col (2002) informaron que en ausencia de LBP, los macrófagos alveolares cultivados con 100 ng/ml de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

endotoxina disminulan la secreción de TNF- $\alpha$  si se les agregaban diferentes concentraciones de alcohol (10 a 100 mmol/L), y si se les añadía LBP la secreción de TNF- $\alpha$  se incrementaba independientemente de la presencia de alcohol. Por otra parte, es importante mencionar que otro receptor importante en la cascada de señalización con LPS, es el *toll like* (TLR), en el que se ha identificado al TLR4 como un receptor importante debido a la presencia de un dominio transmembranal, que es capaz de llevar a cabo la transducción de señales y por tanto la transcripción de genes proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y la óxido nítrico sintetasa inducible (Lazaron y col. 2002).

Analizando todos los resultados, podemos observar que las células acinares fueron más sensibles, ya que tuvieron mayor respuesta a los tóxicos, a pesar de que no se observó mayor mortalidad. Se puede considerar que al ser la célula acinar más sensible que las células ductales, su potencial de respuesta aumenta cuando otros factores ambientales se presenten y por tanto, la respuesta será mucho mayor. Esto es, durante un cuadro de pancreatitis aguda alcohólica, la célula sensibilizada será capaz de responder y contribuir de manera importante a la respuesta inflamatoria pancreática y sistémica. En cuanto a la respuesta al tratamiento con LPS un punto interesante a contemplar, es su capacidad de modificar el efecto del ETOH o AC cuando se combina con ellos. Las células respondieron al LPS tanto de manera independiente como combinada y en particular, las células acinares son las que tuvieron mayor respuesta, por lo que no se puede descartar la presencia de algunos de los receptores antes mencionados. Al parecer, la contribución en este punto de las células ductales es menor, aunque no se descarta que también respondan a la agresión, a mayor concentración de los agentes tóxicos y/o a una exposición más prolongada de ellos. Probablemente la diferencia en la respuesta frente a los tóxicos entre una y otra línea celular esté relacionada con sus características estructurales y funcionales, ya que las acinares están dedicadas a la secreción de enzimas pancreáticas y las ductales, que son epiteliales más expuestas al medio externo, secretan un líquido rico en bicarbonato que alcaliniza e hidrata a las secreciones primarias ricas en proteínas de la célula acinar .

## Conclusiones

1. Las líneas celulares AR42-J y Capan-1 presentaron una viabilidad alta a las 6 h de tratamiento con ETOH, AC, LPS, ETOH+LPS y AC+LPS.
2. La función e integridad celular, no se vio comprometida con ninguno de los tratamientos, en ambas líneas celulares, aunque las células acinares presentaron valores disminuidos de amilasa.
3. El ETOH, AC y LPS provocaron una tendencia a incrementar la secreción de TNF- $\alpha$  ( $p = 0.068$ ) en las células AR42-J con un tiempo de exposición de 6 h.
4. Las células AR42-J no secretaron IL-6 en forma basal ni bajo el estímulo de los tóxicos estudiados.
5. Cuando se expusieron las líneas celulares a los tratamientos combinados, el LPS no potenció el daño celular sino que pareció atenuarlo.
6. En ninguna línea celular se observó daño lipoperoxidativo.
7. Las células acinares fueron más sensibles al tratamiento con LPS que las células ductales.
8. Las células acinares no respondieron a la adición *in vitro* de ETOH, AC y LPS a través de la generación de citocinas proinflamatorias, mientras que las células ductales a pesar de producir estas citocinas no contribuyeron al proceso inflamatorio bajo las condiciones experimentales del presente trabajo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Bibliografia

Abe R, Shimosegawa, S Morizumi, Kikuchi Y, Kimura K, Satoh A, Koizumi M, Toyota T. Lipopolysaccharide induces Manganese superoxide dismutase in the rat pancreas; its role in caerulein pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 217(3); 1995

Albano E, Clot P, Comoglio A, Dianzani MU, Tomasi A. Free Radical activation of acetaldehyde and its role in protein alkylation. *FEBS Letters* 348: 65-69; 1994

Altomare E, Grattagliano I, Vendemiale G, Palmieri V, Palasciano G. Acute ethanol administration induces oxidative changes in rat pancreatic tissue. *Gut* 38(5):742-746; 1996

Amman RW, Mellhaupt B, Meyenberger C, Hentz P. Alcoholic non progressive chronic pancreatitis: prospective long term of a large cohort with alcoholic acute pancreatitis (1976-1990) *Pancreas* 9:365-373; 1994

Ammori BF, Leeder PC, King RF, Barclay GR, Martin IG, Larvin M, McMahon MJ. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: Correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J Gastrointest Surg* 3:252-262; 1999

Bathia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 190: 117-125; 2000

Beaux AC and Fearon CH. Circulating endotoxin, tumor necrosis factor-alpha, and their natural antagonist in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 31(supl) 219: 43-46; 1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg* 21(2):174-180; 1997

Blackstone MO. Can alcohol cause true acute pancreatitis?. *Gastroenterology* 99 (5):1544-1546; 1990

Blanchard JA, Barve S, Joshi-Barve S, Talwalker R, Gates LK. Cytokine production by Capan-1 and Capan-2 cell lines. *Dig Dis Sci* 45 (5); 927-932; 2000

Bradeley EL. A clinically based classification system for acute pancreatitis. *Ann Chir* 47:537-541; 1993

Braganza JM, Wickens DG, Cawood P, Dormandy TL. Lipid-peroxidation (free-radical-oxidation) products in bile from patients with pancreatic disease. *Lancet* 13;2(8346):375-9; 1983

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-310; 1978

Chen X, Ji Bernest SA, someone D, Logsdon CD. NFkB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* 122:448-457; 2002

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159;1987

Dabrowski A, Chwiecko M. Oxygen radicals mediate depletion of pancreatic sulfhydryl compounds in rats with cerulein-induced acute pancreatitis. *Digestion* 47:15-19; 1990

Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, Gabryelewicz A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 377:1-11; 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

De Jersey J, Treolar T. Biosynthesis and possible pathological significance of fatty acid ethyl esters. Alcohol Alcohol 2:171-176; 1994

Denham W, Yang J, Fink G, Denhan D, Coster G, Bowers V, Norman J. TNF but not IL-1 decreases pancreatic acinar cell survival without affecting exocrine function: A study in the perfused human pancreas. J Surg Res 74:3-7; 1998

Domelsmith LN, DeLucca AJ, Fischer JJ. Detoxification of Enterobacter agglomerans LPS. Cotton Dust Proceedings of the 14<sup>th</sup> Cotton Dust Research Conference, Beltwide Cotton Research Conferences, Las Vegas, NV, January 12-13, 1990, RR Jacobs, PJ Wakelyn and LN Domelsmith, Editors; Memphis, TN, National Cotton Council, pages 13-19 1990

Estival A, Clemente F, Ribet S. Metabolism of ethanol by normal pancreatic cells and pancreatic tumor cells. En Sarles H, Johnson CD, Sauniere JF:Pancreatitis. New Data and geographical distribution. Paris, Arnette-Blackwell:45-52; 1991

Exley AR, Leese T, Holliday MP, Swann RA, Cohen J. Endotoxaemia and serum tumor necrosis factor as prognostic markers in severe acute pancreatitis. Gut 33:1126-1128; 1992

Fernandez del Castillo C, Rauner DW, Warshaw AC. Acute pancreatitis. Lancet 342:475-478; 1993

Fernández E, Fallon MJM, Frazier ML, Lorens R, Cuchillo CM. Expression of acinar and ductal products in Capan-1 cells growing in synthetic serum and serum free media. Cancer 73: 2285-95; 1994

Fomela LJ, McLaughlin PJ, Flanagan BF, Southern SN, Giles TE, McDicken IF, Kingsnoth AN. Demonstration of tumor necrosis factor in pancreatic cells by in situ hybridization in a model of acute pancreatitis (abstract). Gut 35:575; 1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Fortunato F, Gates LK. Alcohol feeding and lipopolysaccharide injection modulate apoptotic effectors in the rat pancreas in vivo. *Pancreas* 21(2):174-180; 2000

Fridovich I. Oxygen radicals from acetaldehyde. *Free Radic Biol Med* 7:557-558; 1989

Githens S: Glutathione metabolism in the pancreas, compared to liver, kidney and small intestine. *Int J Pancreatol* 8:97-109; 1991

Greenberg S, Xie J, Ouyang J, Zhao X. Ethanol metabolism is not required for inhibition of LPS-stimulates transcription of inducible nitric oxide synthase. *Alcohol* 17 (3): 203-213; 1999

Gronroos JM, Kaila T, Hietaranta AJ. Alcohol, pancreatic muscarinic receptors and acute pancreatitis. *Exp Toxicol Pathol* 45(8):503-505; 1994

Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky, Pandol S. Pancreatic acinar cells produce, release and respond to tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Clin Invest* 100: 1853-1862; 1997

Gukovskaya AS, Mouria M, Gukovsky I, Reyes CN, Kasho VN, Faller LD, Pandol SJ. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. *Gastroenterology* 122:106-118; 2002

Gut A, Shiel N, Kay PM, Segal I, Braganza JM, Heightened free radical activity in blacks with chronic pancreatitis at Johannesburg, South Africa. *Clin Chim Acta* 31;230(2):189-99; 1994

Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41(12):1819-1828; 1995

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Guyan PM, Uden S, Braganza JM. Heightened free radical activity in pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 8(4):347-54; 1990

Haber PS, Wilson JS, Apte MV, Pirola RC. Fatty acid ethyl esters increase rat pancreatic lysosomal fragility. *J Lab Clin Med* 12(6):759-64; 1993

Haber PS, Wilson J, Apte M, Korstenn M, Pirola R. Individual susceptibility to alcoholic pancreatitis: still an enigma. *J Lab Clin Med* 125:305-312; 1995

Haber PS, Apte MV, Applegate TL, Norton ID, Korstein MA, Pirola RC, Wilson JS. Metabolism of ethanol by rat pancreatic acinar cells. *J Lab Clin Med* 132: 294-302; 1998

Hamamoto T, Yamada S, Hirayama C. Nonoxidative metabolism of ethanol in the pancreas: implication in alcoholic pancreatic damage. *Biochem Pharmacol* 39: 241-245; 1990

He Z, Eriksson P, Albo H, Harmoinen A, Nordback IH. Effects of endogenous acetaldehyde production by disulfiram and ethanol feeding on rat pancreas. *J Gastrointest Surg* 5:531-539; 2001

Hietaranta AJ, Saluja AK, Bhagat L, Suigh VP, Song AM, Steer ML. Relationship between NFkB and Trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 280(1):388-395; 2001

Ho Hung S, Frey CF. Sistema de clasificación de la pancreatitis aguda. En *Páncreas*. Ed. McGraw-Hill Interamericana, p135-141; 2000

Hoek JB, Thomas AP, Rooney TA, Higashi K, Rubin E. Ethanol and signal transduction in the liver. *FASEB J* 6:2386-2396; 1992

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Honda S, Fujioka T, Shiota K, Fujiyama K, Kubota T, Murakami K, Nasu M. Effects of ethanol on the pancreas of disulfiram-treated rats. *J Gastroenterol* 30:231-236; 1995

Hwang C, Sinsky AJ, Lodish HF. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257:1496-1502; 1992

Inagaki T, Hoshino M, Hayakawa T, et al. Interleukin-6 is a useful marker early prediction of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas* 14:1-8; 1997

Iovanna JL, Orelle B, Keim V, Dagorn JC. Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis. *J Biol Chem* 266(36):24664-24669; 1991

Jaworek J, Jachimczak B, Tomaszewska R, Konturek PC, Pawlik WW, Sendur R, Hahn EG, Stachura J, Konturek SJ. Protective action of lipopolysaccharides in rat cerulein-induced pancreatitis: Role of nitric oxide. *Digestion* 62:1-13; 2000

Katz M, Cerangelo R, Miller LJ, Goerlick F. Effect of ethanol on cholecystokinin-stimulated zymogen conversion in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* 270:G171-G175; 1996

Kim H, Seo LY, Roh KH, Lim JW, Kim KH. Suppression of NFkB activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med* 29(7):674-683; 2000

Kimura K, Shimosegawa Y, Reishi A, Masamune A, Satoh A, Takasu A, Koizumi M, Toyota T. Low doses of lipopolysaccharide upregulate acinar cell apoptosis in cerulein pancreatitis. *Pancreas* 17(2):120-126; 1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Kitson KE, Bosron W, Pares X, Lindros K, Weiner H, Li TK. Ethanol and acetaldehyde metabolism: past, present and future. *Alcohol Clin Exp Res* 20:82A-92A; 1996

Kruse P, Anderson ME, Loft S. Minor role oxidative stress during intermediate phase of acute pancreatitis in rats. *Free Radic Biol Med* 30(3): 309-317; 2001

Lauterburg BH, Bilzer M. Mechanisms of acetaldehyde hepatotoxicity. *J Hepatol* 7:384-390; 1988

Lazaron V, Dunn DL. Molecular biology of endotoxin antagonism. *World J Surg* 26:790-798; 2002

Le Petit-Thevenin J, Pasqualini E, Nobili O, VérineA, Lombardo D. Effects of ethanol on the expression and secretion of bile salt-dependent lipase by pancreatic AR42-J cells. *Biochim Biophys Acta* 1408:44-54; 1998

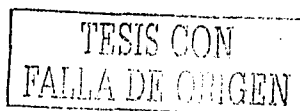
Lewin MB, Wong A, Deveney CW, Sankaran H. Reversible acetaldehyde inhibition of A 23187-stimulated amylase secretion from isolated rat pancreatic acini. *FEBS Lett* 184:259-262; 1985

Lieber CS. Metabolism of ethanol and associated hepatotoxicity. *Drug Alcohol Rev* 10:175-202; 1991

Lieber CS. Acetaldehyde and acetate. In: Lieber CS, editor. *Medical and nutritional complications of alcoholism: mechanism and management*. New York:Plenum Publishing. P.37-54; 1992

Lowry SF. Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 128:1235-1241; 1993

Lu Z, Karne S, Kolodczik T, Gorelick FS. Alcohol enhance caerulein-induced zymogen activation in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(3): G501-507; 2002



Majumdar APN, Vesenkas GD, Dubick MA, Yu GSM, De Morrow JM, Geokas MC. Morphological and biological changes of the pancreas in rats treated with acetaldehyde. *Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol)* 250:G598-G606; 1986

Mandrekar P, Catalano D, Szabo G. Inhibition of lipopolysaccharide-mediated NF $\kappa$ B activation by ethanol in human monocytes. *Int. Immunol* 11(11):1781-1790; 1999

Mann DV, Hershman MJ, Hillinger R, Glazer G. Multicentre audit of death in acute pancreatitis. *Br J Surg* 81:890-893; 1994

Mayeux PR, Shah SV. Intracellular calcium mediates the cytotoxicity of lipid A in LLC-PK cells. *J Pharmacol Exp Ther* 266:47-51; 1993

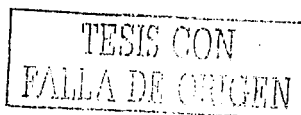
Nakatani Y, Fukui H, Kitazawa Y, Fujimoto M, Yamao J, Uemura M. Effect of alcohol on the secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  by macrophages in the presence of rat serum. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 26(8):81S-85S; 2002

Neuschwander-Tetri BA, Ferrell LD, Sukhabote RJ, Grendell JH. Glutathione monoethyl ester ameliorates cerulein-induced pancreatitis in the mouse. *J Clin Invest* 89:109-116; 1992

Neuschwander-Tetri B, Presti ME, Wells LD. Glutathione synthesis in the exocrine pancreas. *Pancreas* 14(4): 342-349; 1997

Niemela O. Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radic Biol Med* 31(2):1533-1538; 2001

Nonaka A, Manabe T, Asano N, Yamaki K, Oshio G, Hirano T, Tobe T. Effect of endotoxin on digestive enzyme and superoxide dismutase in mouse pancreas. *Digestion* 44:148-154; 1989



Nordback I, Macgowan S, Potter JJ, Cameron JL. The role of acetaldehyde in the pathogenesis of acute alcoholic pancreatitis. *Ann Surg* 214:671-678; 1991

Nordback I, Cameron JL. The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in acute pancreatitis in the canine isolated pancreas preparation. *Surgery* 113:90-97; 1993

Norman JG, Fink GW, Franz MG Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg* 130:966-970; 1995

Normann JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sixton Ch, Falkner J, Gower WR, Franz MG. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 42(8): 1783-1788; 1997

Norton ID, Apte MV, Haber PS, McCaughan GW, Pirola RC, Wilson JS. Cytochrome P4502E1 is present in rat pancreas and is induced by chronic ethanol administration. *Gut* 42: 426-430; 1998

Ortiz EM, Duselli NJ, Vasseur S, Malka D, Bödeker H, Dagornn JC, Iovanna JL. *Gastroenterology*. 114: 808-816; 1998

Osman MO, Jensen SL. Acute pancreatitis: the pathophysiological role of cytokines and integrins. *Dig Surg* 16:347-362; 1999

Pitchumoni CS. Pathogenesis of Alcohol-Induced chronic Pancreatitis. Facts, Perceptions and Misperceptions. *Surg Clin of North America* 81 (2): 379-390; 2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Ponnappa Bc, Hoek JB, Waring AJ, Rubin E. Effect of ethanol on amylase secretion and cellular calcium homeostasis in pancreatic acini from normal and ethanol-fed rats. *Biochem Pharmacol* 36(1):69-79; 1987

Pozsár J, Schwab R, Simon K, Fekete L, Orgován G, Pap Ákos. Effect of endotoxin administration on the severity of acute pancreatitis in two experimental models. *Int J Pancreatol* 22(1); 31-37; 1997

Pritos C A. Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system. *Chemico-Biological Interactions* 129: 195-208; 2000

Proksch JW, Traylor LA, Mayeux PR. Effects of lipid A on calcium homeostasis in proximal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* 276:555-560; 1996

Rivero Rosas H, Julian Sánchez A, Piña E. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch Med Res* 28(4): 453-471; 1997

Robles Díaz G, Vargas F, Uscanga L, Fernandez de Castillo C. Chronic pancreatitis in México City. *Pancreas* 5:479-483; 1990

Robles-Díaz G, Gorelick FS. Alcohol and Acute Pancreatitis. *Yale J Biol Med* 70: 77-87; 1997

Runkel NS, Moody FG, Smith GS, Rodríguez LF, LaRocco MY, Miller TA. The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. *J Surg Res* 51:18-23; 1991

Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis. *Current Concepts. J Clin Gastroenterol* 304(4): 343-356; 2000

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Sankaran H, Lewin MB, Wong A, Deveney CW, et al. Irreversible inhibition by acetaldehyde of cholecystokinin acini. *Biochem Pharmacol* 34:2859-63; 1985

Sarles H, Adler G, Dani R, Frey C, Gullo L, Harada H, Martin E, Norohna M, Scuro LA. The pancreatitis classification of Marseille-Rome 1988. *Scand J Gastroenterol* 24(6):641-2; 1989

Sarles H, Johnson CD and Saunliere JF. Pancreatitis new data and geographical distribution. Paris: Arnette-Blackwell 1991

Schoenberg MH, Buchler M, Gaspar M, Stinner A, Younes M, Melzner I, et al. Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat. *Gut* 31:1138-1143; 1990

Schoenberg MH, Birk Dieter, Beger HG. Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr* 62: 1306S-14S; 1995

Scholmerich J. Interleukins in acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 31(suppl 219):32-36; 1996

Schulz HU, Niederau C, Klonowski-Stumpe H, Halangk W, Luthen R, Lippert H. Oxidative stress in acute pancreatitis. *Hepatology* 46(29):2736-2750; 1999

Segal I. Pancreatitis in Soweto, South Africa. Focus on alcohol-related disease. *Digestion* 59 (suppl 4):25-35; 1998

Singh M, Simsek H. Ethanol and Pancreas. Current Status. *Gastroenterology* 98: 1051-1062; 1990

Steer Michael. Pancreatitis severity: Who calls the shots? *Gastroenterology* 122(4); 1168-172; 2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Stowell A, Hillborn M, Salaspuro M, Lindros KO. Low acetaldehyde levels in blood, breath and cerebrospinal fluid of intoxicated humans as assayed by improved methods. *Adv Exp Med Biol* 32:635-645; 1980

Suazo J, Robles Díaz G. Función de las citocinas en las pancreatitis: implicaciones fisiopatológicas. En: *Páncreas*. Ed: Mc Graw Hill-Interamericana. p 121-134; 2000

Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: Bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 20:411-417; 1996

Sweiry JH, Mann GE. Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute Weber H, Merkord J, Janas L, Wagner A, Schröder H, Käding U, Werner A, Dummier W. Oxygen radical generation and acute pancreatitis: effects of dibutyltin dichloride/ethanol and ethanol on rat pancreas. *Pancreas* 11 (4): 382-388; 1995

Szabo G, Mandrekar P and Catalano D. Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 beta, TNF-alpha and IL-6 production by acute ethanol treatment. *J Leukoc Biol* 58:342-350; 1995

Takamory H, Oades ZG, Hoch RC, Burger M, Schraufstatter IU. Autocrine growth effect of IL-8 and GRO- $\alpha$  on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1. *Pancreas* 21(1):52-56; 2000

Tietze F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27:502-522; 1969

Tracey KJ, Lowrey SF. The role of cytokine mediators in septic shock. *Adv Surg* 23:21-56; 1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tran DD. Interleukin-6 in the early assessment of acute pancreatitis (letter) Gut 34:1467; 1993

Tsujita T, Okuda H. The synthesis of fatty acid ethyl ester by carboxylester lipase. Eur J Biochem 224:57-62; 1994

Uruñuela A, Sevillano S, De la Mano AM, Manso MA, Ramudo L, De Dios I. Time-course of Free Radical Production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. Pancreatology 2:217-361; 2002

Vaccaro MI, Calvo EL., Suburo AM, Sordelli DO, Lanosa G, Iovanna JL. Lipopolysaccharide directly affects pancreatic acinar cells: implications on acute pancreatitis pathophysiology. Dig Dis Sci 45(5); 915-926; 2000

Walling MA. Xenobiotic metabolism, oxidant stress and chronic pancreatitis. Digestion 59(suppl 4): 13-24; 1998

Wang X, Wang B, Wu J. Pancreatitis-associated-protein I mRNA expression in mouse pancreas is upregulated by lipopolysaccharide independent of cerulein-pancreatitis. J Gastroenterol Hepatol 16(1):79-86; 2001

Watanabe A, Kobayashi M, Hobará N, et al. A report of unusually high blood ethanol and acetaldehyde in two surviving patients. Alcoholism 9:14-16; 1985

Weber H, Merkord J, Janas L, Wagner A, Schröder H, Käding U, Werner A, Dummmler W. Oxygen radical generation and acute pancreatitis: effects of dibutyltin dichloride/ethanol and ethanol on rat pancreas. Pancreas 11 (4): 382-388; 1995

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Wig JD, Kochhar R, Ray JD, Krishna DV, Gupta NM, Ganguly NK. Endotoxemia predicts outcome in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 26(2):121-24; 1998

Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Mouri H, Sawabu N. Induction of chemokine in rat pancreatic acinar cell injury. *Pancreas* 24(2):198-204; 2002

Yu Honggang, Klonowski-Stumpe H, Lüthen R. Glutathione might exert an important function in caerulein-stimulated amylase release in isolated rat pancreatic acini. *Pancreas* 24;53-62; 2002

Yuasa Ch, Irimura K, Oka T. Ethanol administration delays recovery from acute pancreatitis induced by exocrine hyperstimulation. *J Pharmacol Toxicol Methodol* 39(4):221-228; 1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO DEBE  
SER PUBLICADA