



TESIS DOCTORAL

**Efecto de antioxidantes sobre un modelo
experimental de pancreatitis aguda
inducida por ceruleína en rata**

-

**Efeito de antioxidantes sobre um modelo
experimental de pancreatite aguda
induzida por ceruleina em rato**

CRISTINA CARRASCO ROMERO

Departamento de Fisiología

Junio 2014



TESIS DOCTORAL

**Efecto de antioxidantes sobre un modelo
experimental de pancreatitis aguda inducida
por ceruleína en rata**

CRISTINA CARRASCO ROMERO

Departamento de Fisiología

Conformidad del/los Director/res:

Fdo. José A. Pariente Llanos

Fdo. Ana B. Rodríguez Moratinos

2014

Presentada para optar al título de **Doctor Europeo** por la Universidad de
Extremadura



**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

Avd. de Elvas s/n
06006 Badajoz (España)

D. JOSÉ ANTONIO PARIENTE LLANOS, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura y **D^a. ANA BEATRIZ RODRÍGUEZ MORATINOS**, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, presentada por **D^a. CRISTINA CARRASCO ROMERO**, con el título "Efecto de antioxidantes sobre un modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en rata", ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura, y entendiendo que reúne los requisitos establecidos, autorizamos su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Badajoz, a 16 de Junio de 2014.

Fdo. José A. Pariente Llanos

Fdo. Ana B. Rodríguez Moratinos

La realización de la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias al apoyo económico de las siguientes entidades:

- Beca de Investigación para Licenciados/Graduados dentro del Programa de Captación y Formación de Recursos Humanos de Excelencia en Investigación, Desarrollo e Innovación. Universidad de Extremadura (nº 106).
- Ministerio de Ciencia e Innovación (Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional I+D+i) en colaboración con el Fondo Social Europeo de Desarrollo Regional (BFU2010-15049).
- Ayuda del programa propio de la Universidad de Extremadura para el grupo de investigación “Neuroinmunofisiología y Crononutrición” (Re: PPGRU12L2).
- Apoyos a los planes de actuación de los grupos catalogados – Grupo Neuroinmunofisiología y Crononutrición (NIFCRO) (GR10003).



GOBIERNO DE EXTREMADURA

Consejería de Empleo, Empresa e Innovación



UNIÓN EUROPEA

Fondo Europeo de Desarrollo Regional

Una manera de hacer Europa

Producción científica derivada de esta Tesis Doctoral:

1. Artículos científicos:

Carrasco C, Marchena AM, Holguín-Arévalo MS, Martín-Partido G, Rodríguez AB, Paredes SD, Pariente JA. Anti-inflammatory effects of melatonin in a rat model of caerulein-induced acute pancreatitis. *Cell Biochem Funct* 2013;31:585-590.

Carrasco C, Holguín-Arévalo MS, Martín-Partido G, Rodríguez AB, Pariente JA. Chemopreventive effects of resveratrol in a rat model of cerulein-induced acute pancreatitis. *Mol Cell Biochem*. 2014;387:217-225.

Carrasco C, Rodríguez AB, Pariente JA. Effects of melatonin on oxidative damage and pancreatic antioxidant defenses in a rat model of cerulein-induced acute pancreatitis. *HBPD INT* (en prensa).

2. Trabajo presentado en congresos:

"Anti-inflammatory effects of Melatonin in Caerulein-induced Acute Pancreatitis". Congreso de la Federación de Sociedades Fisiológicas Europeas en Santiago de Compostela (FEPS 8-11 de Septiembre del 2012).

Y al final... se CUMPLIÓ.

Al principio de este viaje, cuando siendo estudiante imaginaba mi futuro, era consciente del esfuerzo y de la constante carrera de fondo que suponía dedicarse a la investigación. ¡Pero era mi sueño! Y, aunque en los sueños que perseguimos suelen aparecer obstáculos más o menos salvables, una no se llega a imaginar crisis económicas que lo destruyen todo a su paso... Así que, con este choque de realidad, comencé mi carrera científica y mi madurez.

La primera puerta a la que llamé me permitió dar los primeros pasos, y hasta pensé que tendría suerte y conseguiría eludir el futuro incierto que ya se sentía en todos los rincones del país. Por ello, les estaré siempre agradecida a los doctores José Gutiérrez Fernández y Antonio Sorlózano Puerto del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada por su interés, compromiso y confianza en mi sueño y por todo lo que me enseñaron acerca de la profesión. A pesar de la lucha, y en mitad de la tormenta, no pudieron hacer más que aconsejarme y dejarme ir.

Y así (dejando atrás una ciudad, una vida, otro sueño...), comenzó la segunda parte del viaje. Cómo agradecer suficiente al Grupo de Neuroinmunofisiología y Crononutrición de la Universidad de Extremadura la acogida y la oportunidad que me brindaron, cuando ya comenzaba a renunciar al sueño. Quisiera agradecer a mis directores de tesis, el Dr. José A. Pariente Llanos y la Dra. Ana B. Rodríguez Moratinos su profesionalidad, su vitalidad y su cariño. Sois un ejemplo para mí y, a pesar de la sorpresa que supuso mi llegada, me habéis empujado desde el principio a continuar soñando hasta el día de hoy. También quisiera agradecer a la Dra. Carmen Barriga Ibars su apoyo y su experiencia. Esperemos que nuestros sueños conjuntos se cumplan y podamos brindar por ellos.

A todos y cada uno de mis compañeros, a los que tuvieron que marcharse involuntariamente a distintos puntos del mundo para continuar sus viajes vitales (Cristina, Iñaki y Sergio) y a los que siguen aquí luchando día a día por sus propios sueños (Ana, Carmen, David, Lourdes, Javi, Jonathan, Rafa y Yolanda): GRACIAS. Sin duda alguna, todos y cada uno de vosotros me habéis enseñado algo valioso (y algunas, hasta me habéis llenado los días de alegría y cariño y me habéis equipado para sobrevivir en el extranjero...). Con los años, he aprendido a aceptar que las personas con las que compartimos el escenario de nuestras vidas, son como personajes secundarios que entran y salen. Nunca pensé que tuviera la suerte de volver a disfrutar de una de las actrices del principio de este viaje. Por ello, quería agradecerle especialmente a María su papel en esta vuelta a los orígenes. Y por último, agradecer a la habitante del despacho más

Agradecimientos

acogedor del departamento, Elena Circujano, sus consejos y sus carcajadas junto a la fotocopidora.

Al grupo de investigación *Redox Biology* del Centro de Química y Bioquímica de la Universidad de Lisboa por compartir conmigo su experiencia y permitirme realizar este Doctorado Europeo, y en especial a las doctoras Luisa Cyrne, Susana Marinho y Carla Real por su apoyo, alegría y cariño. Y, desde la admiración, a la Dra. Helena Soares, que tantas horas me dedicó en esos 3 meses y sin la que la experiencia *alfacinha* no hubiera sido la misma.

A mis amigos y familia al completo, por confiar en mi potencial aun cuando no entendíais muy bien de qué iba esta aventura. A mi hermana Esther, por su referencia profesional y a mis padres Ina y Antonio, por haberme educado y dado alas para ser una mujer moderna, culta y soñadora. Gracias a vosotros soy la persona y la científica que siempre soñé, y os admiro por ello.

A Otto, por acompañarme en la aventura lisboeta y por tantos momentos de dedicación incondicional mientras perseguía este sueño humano.

Y a Alfonso (el pilar fundamental de mi vida, el sueño de aire fresco que se hizo realidad, el gran hombre que nunca ha temido asomarse conmigo al precipicio que tantas veces se ha presentado bajo nuestros pies...). Sin ti, éste y otros sueños no hubieran sido tan maravillosos y enriquecedores. Y lo mejor de todo es que, juntos, somos una fábrica de hacer los sueños realidad...

Y es que... "La vida es sueño"

(Calderón de la Barca)

ABTS®: 2,2'-Azino-di-[3-etilbenziazolin sulfonato]

AC: Absorbancia corregida

AFMK: N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinuramina

AMPK: Proteín quinasa activada por adenosín monofosfato

AP-1: Proteína activadora 1

BHT: Butilhidroxitolueno

BME: Medio basal Eagle

BSA: Albúmina sérica bovina

CAT: Catalasa

CCK: Colecistoquinina

CLSPA: Colagenasa purificada

COX: Enzima ciclooxigenasa

COX2: Enzima ciclooxigenasa 2

CNP: 2-cloro-4-nitrofenol

CNPG₂: 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltósido

CNPG₃: 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotrióside

Cu-SOD: Cobre-superóxido dismutasa

DAMP: Patrones moleculares asociados al daño

DNHP: Dinitrofenilhidrazina

DTT: Ditiotreitól

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

ERO: Especies reactivas de oxígeno

Fura-2AM: Fura 2-acetilmetiléster

G: Glucosa

G₃: Maltotriosa

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina-etanosulfónico

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

ICAM-1: Molécula señalizadora intercelular-1

IF- γ : Interferón- γ

IFM: Intensidad de fluorescencia media

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-4: Interleuquina 4

IL-6: Interleuquina 6

IL-8: Interleuquina 8

IL-10: Interleuquina 10

IMC: Índice de masa corporal

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

LOH: Alcoholes de peróxidos lipídicos

LOO[•]: Radical peroxilo

LOOH: Peróxidos lipídicos

LOX: Enzima lipoxigenasa

MDA: Malondialdehído

MES: Ácido morfolino etanosulfónico

Mn-SOD: Manganeso-superóxido dismutasa

MPO: Mieloperoxidasa

MT1 y 2: Receptores 1 y 2 de melatonina

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF- $\kappa\beta$: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: Células naturales asesinas

NOS: Óxido nítrico sintasa

O₂^{•-}: Radical superóxido

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONOO⁻: Radical peroxinitrito

PA: Pancreatitis aguda

PAF: Factor de agregación plaquetaria

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

QN2: Quinona reductasa 2

RLs: Ratios linearizados

SDR: Síndrome de distrés respiratorio

SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SIRT1: Sirtuina 1

SOD: Superóxido dismutasa

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

vATPasa: ATPasas vacuolares

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

Zn-SOD: Zinc-superóxido dismutasa

αT^{\bullet} : radical tocoferol

$\bullet NO$: Óxido nítrico

1O_2 : Oxígeno singlete

$\bullet OH$: Radical hidroxilo

4-HNE: 4-hidroxinonenal

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	Pág.
1.1. EL PÁNCREAS EXOCRINO	
1.1.1. Páncreas exocrino: localización, morfología y funcionalidad	3
1.1.2. La célula acinar: características de su función secretora	5
1.2. PANCREATITIS AGUDA	
1.2.1. Epidemiología y causas	7
1.2.2. Fisiología y fisiopatología del páncreas	9
1.2.3. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento	12
1.2.4. Modelos experimentales: pancreatitis aguda inducida por ceruleína	15
1.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES	
1.3.1. Especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres	18
1.3.2. Sistema de defensa antioxidante	20
1.3.3. Antioxidantes dietéticos	22
1.3.3.1. Melatonina	23
1.3.3.2. Resveratrol	27
1.4. SUPLEMENTACIÓN ANTIOXIDANTE Y PANCREATITIS AGUDA	30
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS / JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS	35
3. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1. MATERIAL	
3.1.1. Reactivos	45
3.1.2. Aparatos	47
3.1.3. Material biológico	48
3.1.4. Soluciones	48
3.2. MÉTODOS	
3.2.1. Diseño experimental	53

ÍNDICE

3.2.2. Obtención de muestras biológicas	54
3.2.3. Determinación de la concentración de corticosterona	56
3.2.4. Determinación de la concentración de amilasa	58
3.2.5. Determinación de la concentración de lipasa	59
3.2.6. Determinación de la actividad antioxidante total	60
3.2.7. Determinación de la concentración de citocinas	64
3.2.8. Determinación del grado de lipoperoxidación	66
3.2.9. Determinación de la actividad enzimática superóxido dismutasa	68
3.2.10. Determinación de la actividad enzimática glutatión peroxidasa	70
3.2.11. Determinación del grado de oxidación proteica	72
3.2.12. Medición de la concentración intracelular de calcio	74
3.2.13. Estudio y valoración de parámetros histopatológicos	75
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
4. RESULTADOS	79
4.1. Efectos anti-inflamatorios de la melatonina en un modelo de pancreatitis aguda inducido por ceruleína en rata	83
4.2. Efectos de la melatonina sobre el daño oxidativo y las defensas antioxidantes pancreáticas en un modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en rata	91
4.3. Efecto quimiopreventivo del resveratrol en un modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en rata	99
5. DISCUSIÓN GENERAL	111
6. CONCLUSIONES / CONCLUSÕES	123
7. BIBLIOGRAFÍA	131

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL PÁNCREAS EXOCRINO

1.1.1. Páncreas exocrino: localización, morfología y funcionalidad

El páncreas (πᾶν todo, κρέας carne) es un órgano de situación retroperitoneal, aspecto gris rojizo y consistencia más o menos dura. De unos 20 centímetros de longitud, posee una forma plana y alargada, adaptándose de esta manera a los órganos vecinos. El páncreas cruza el abdomen por el lado izquierdo a la altura de la primera vértebra lumbar, desde el bazo hasta las asas duodenales, por detrás del estómago; de ahí que escape al examen físico directo. En él se distinguen la cabeza (caput), el cuerpo (corpus) y la cola (cauda). El conducto pancreático principal o de Wirsung es el que drena la mayor parte de la glándula hacia la luz duodenal. Sin embargo, en algunas especies animales existe un conducto pancreático secundario o de Santorini, que vierte al duodeno por una pequeña carúncula accesoria (Figura 1) (Tresguerres, 1992; Netter, 1994; Pocock y cols., 2005).

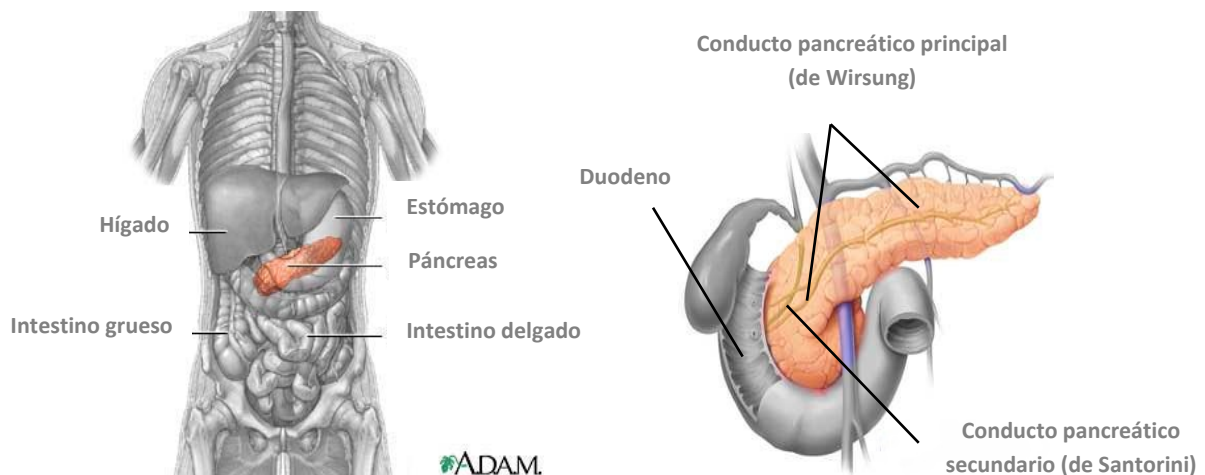


Fig. 1. Localización y detalle anatómico del páncreas

(Modificado de: Medline Plus Medical Encyclopedia Image)

De función glandular mixta, el páncreas posee una rica inervación extrínseca, tanto simpática como parasimpática, y un sistema vascular que interrelaciona íntimamente sus partes endocrina y exocrina. De esta forma, se genera un tipo de sistema porta en el que la parte exocrina recibe sangre rica en hormonas pancreáticas procedentes de la parte endocrina, quedando justificada la estrecha conexión funcional entre ambas (Tresguerres, 1992). Por su parte, los conductos linfáticos del páncreas confluyen desde el interior de la glándula hasta su superficie. En los puntos donde el órgano entra en íntimo contacto con la pared abdominal exterior u otras estructuras retroperitoneales, tales como el duodeno, existen conexiones

linfáticas directas. Esto podría explicar la rápida propagación de carcinoma o infecciones desde el páncreas a otras estructuras (Netter, 1994).

La porción pancreática exocrina aparece como la típica glándula túbulo-alveolar de disposición intralobulillar, fuertemente ramificada. Su estructura secretora básica es el acino, compuesto por 20-50 células acinares de forma piramidal que se disponen en monocapa en torno a un único conducto terminal o intercalado. En él se vierten las enzimas digestivas que, conducidas a través del sistema ductal y junto con la porción hidroelectrolítica sintetizada en las sucesivas ramas del mismo, llegarán a la segunda porción del duodeno para facilitar la digestión de los alimentos (Tresguerres, 1992; Lizarazo, 2008) (Figura 2).

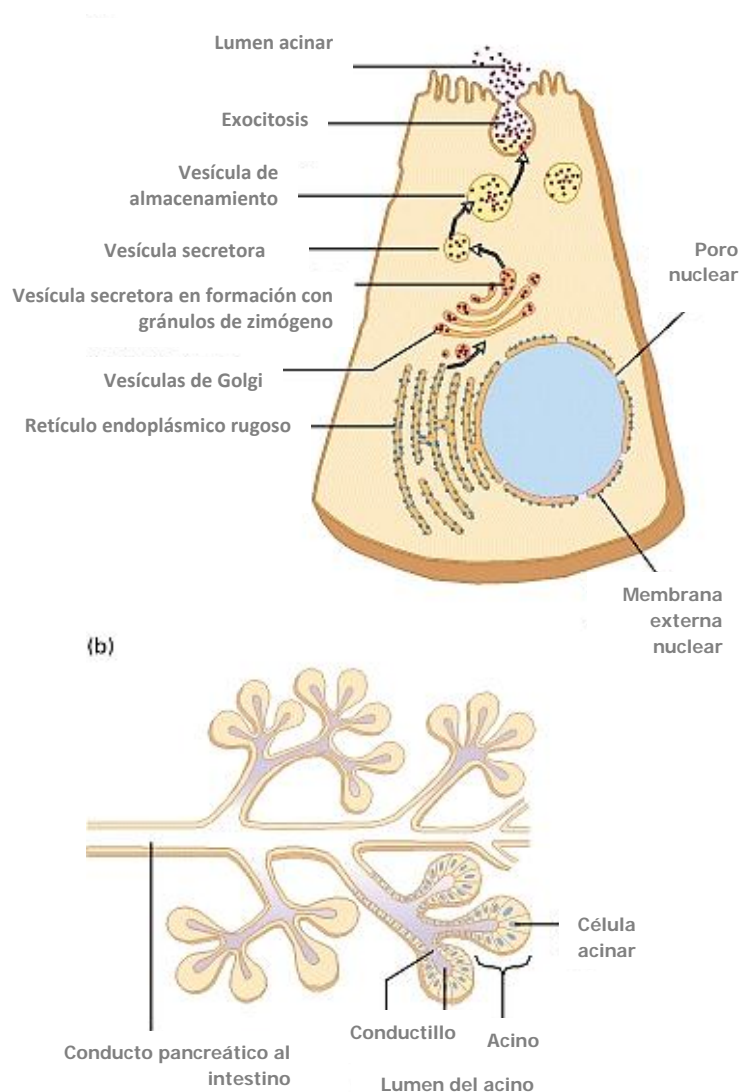


Fig. 2. Detalle de célula acinar y acino pancreático
(Modificado de: Lodish y cols., 2000)

1.1.2. La célula acinar: características de su función secretora

Las células acinares suponen más del 80% del volumen total del páncreas (Kelley, 1992; Pocock y cols., 2005) y se caracterizan por una marcada polarización en su citoplasma, siendo éste basófilo en la región basal y acidófilo en la apical, donde se almacenan los gránulos de zimógeno (Ross, 2011). Realizan las siguientes tres actividades fundamentales:

- La admisión de materias primas específicas, principalmente aminoácidos.
- La síntesis de precursores enzimáticos.
- La secreción de los mismos a los sistemas digestivo y circulatorio (Opitz y cols., 1967).

De esta forma, los aminoácidos procedentes de la sangre atraviesan la matriz citoplasmática hasta el núcleo y el retículo endoplasmático, donde son transformados en enzimas. Tras su migración a la región apical, éstas quedarán incluidas por millares en cuerpos lipoproteicos segregados por el aparato de Golgi, conformándose así los gránulos de zimógeno (Opitz y cols., 1967) (Fig. 2). Precisamente este característico almacenamiento de los zimógenos, así como la síntesis adicional de proenzimas inactivas o la presencia parenquimática de inhibidores de tripsina, son algunos de los mecanismos que evitan el fenómeno de autodigestión en la glándula (Opitz y cols., 1967; Tresguerres, 1992; Lizarazo, 2008).

Las enzimas pancreáticas se comportan como hidrolasas y se clasifican en base a la molécula sustrato, tal y como muestra la Tabla 1:

I.	Esterasas	Lipasa Colinesterasa Lecitinasa
II.	Glucosidasas	α- amilasa β- amilasa
III.	Peptidasas	Tripsinógeno Quimiotripsinógeno Procarboxipeptidasa Colagenasa Elastasa
IV.	Nucleasas	Desoxirribonucleasa Ribonucleasa
V.	Fosfatasa	Fosfatasa alcalina

Tabla 1. Enzimas pancreáticas
(Tomada de: Opitz y cols., 1967)

Se calcula que el páncreas vierte a la luz duodenal entre 6 y 20 gramos diarios de enzimas y otras proteínas, en aproximadamente dos litros de jugo pancreático. Es la catepsina B, una enteropeptidasa sintetizada en la mucosa duodenal, la encargada de hidrolizar el tripsinógeno en tripsina; ésta, a su vez, provocará en cascada la activación de otros precursores enzimáticos o zimógenos (Tresguerres, 1992). La secreción de estas enzimas en el organismo depende de diversos estímulos como la edad, los factores hereditarios o la dieta (Opitz y cols., 1967). No obstante, la exocitosis simultánea de sus proformas desde el ápice de las células acinares hace que, durante un breve espacio de tiempo e independientemente del estímulo recibido, exista una proporción interenzimática determinada. Es lo que se conoce como secreción paralela (Tresguerres, 1992).

En relación a la regulación de la secreción pancreática exocrina, es el resultado de una compleja interacción entre estímulos neurales y hormonales, siendo los principales mediadores los contenidos en la Tabla 2:

Neurales y neurotransmisores	Hormonales
Acetilcolina	Colecistoquinina
Péptido intestinal vasoactivo	Gastrina
Sustancia P	Glucagón
Bombesina	Insulina
Opiáceos endógenos	Pancreatona
Péptidos relacionados con la encefalina	Secretina
Neuropéptido Y	Somatostatina
Noradrenalina	

Tabla 2. Mediadores de la secreción pancreática

(Tomada de: Kelley, 1992; Opitz y cols., 1967)

Estos mediadores actúan sobre la célula desencadenando una cascada metabólica, en la que intervienen mensajeros celulares tan comunes como inositol trifosfato, diacilglicerol, ión calcio (Ca^{2+}) y adenosín monofosfato cíclico (AMP_c) (Kelley, 1992).

1.2. PANCREATITIS AGUDA

La pancreatitis aguda (PA) es una enfermedad de carácter inflamatorio, cuya manifestación clínica puede variar entre formas de carácter medio y autolimitante (75-80% de los casos) y formas de pronóstico grave (15-20%), donde el paciente puede llegar a morir en pocos días debido a la aparición de complicaciones locales y/o sistémicas (Wu, 2000; Werner y cols., 2005). Una de las primeras descripciones científicas de la pancreatitis aparece a finales del siglo XIX (Fitz, 1889). En ella, Reginal Fitz expone muchos de los aspectos modernos, tanto desde el punto de vista clínico como patológico, de la PA. En 1925, Sir Berkeley Moynihan comienza su ensayo sobre esta dolencia como *"...la más terrible de las calamidades que ocurren en conexión con las vísceras abdominales. Lo repentino de su aparición, la ilimitada agonía que la acompaña, y la mortalidad relacionada con la misma, la convierte en la más formidable de las catástrofes"* (Moynihan, 1925).

Si bien las altas tasas de mortalidad han disminuido en los últimos años gracias a diversos factores (mayor conocimiento de la enfermedad, avances en las técnicas de imagen que permiten identificar complicaciones en etapas tempranas, aplicación de cuidados intensivos e intervención quirúrgica limitada), la PA continúa siendo un problema socio-económico para los sistemas de asistencia sanitaria de todo el mundo. Tal y como apuntaba Neoptolemo y cols. (1998) a finales del siglo XX, alrededor del 25% de los enfermos de PA podrían desarrollar complicaciones severas o crónicas, que les supondría una alta dependencia de la atención sanitaria de por vida.

1.2.1. Epidemiología y causas

En líneas generales, se puede decir que la tasa de incidencia anual de la PA en el mundo occidental oscila entre 10 y 80 nuevos casos por cada 100.000 habitantes, observándose diferencias entre los datos epidemiológicos de cada país. Según estudios publicados en base a análisis retrospectivos de admisión hospitalaria, existiría una baja tasa de incidencia en países como Holanda y Reino Unido (10-24 nuevos casos por cada 100.000 habitantes al año), frente a los 35-73 nuevos casos por cada 100.000 habitantes al año que se contabilizan en los países escandinavos y Estados Unidos. La edad y el sexo serían factores determinantes, siendo la incidencia más pronunciada a partir de los 35 años en los hombres y de los 55 años en las mujeres (Stimac y cols., 2012). Asimismo, cabe destacar que en la mayoría de países europeos se ha observado un aumento significativo de la incidencia en las últimas décadas, probablemente debido al abuso en la ingesta de alcohol y a la mejora en el diagnóstico de la enfermedad (Steinberg y cols., 1994).

En relación a los desencadenantes de la PA, los cálculos biliares y el abuso en la ingesta de alcohol son las causas más comunes de la enfermedad, suponiendo alrededor del 80% de los casos (Armstrong y cols., 2013). Sin embargo, existen otros factores predisponentes, que se resumen en la Tabla 3:

Causas obstructivas	Coledocolitiasis
	Tumores ampulares o pancreáticos
	Gusanos o cuerpos extraños obstruyendo la papila duodenal
	Páncreas divisum con obstrucción ductal accesoria
	Coledococoele
	Divertículo duodenal periampular
	Esfínter de Oddi hipertensivo
Toxinas y drogas	Toxinas:
	Alcohol, veneno de escorpión, insecticidas organofosforados
Trauma	Drogas :
	Azatioprina y mercaptopurina, ácido valproico, estrógenos, tetraciclina, metronidazol, nitrofurantoína, pentamidina, furosemida, sulfonamidas, metildopa, cimetidina, ranitidina, sulindac, didanosina, acetaminofén, eritromicina, salicilatos.
Anomalías metabólicas	Accidental:
	Traumatismo cerrado en el abdomen
	Iatrogénico:
Infecciones	Trauma postoperativo, colangiopancreatografía retrógrada endoscópica, esfingotomía endoscópica, manometría del esfínter de Oddi
	Hipertrigliceridemia
Factores miscelánea	Hipercalcemia
	Parasitarias:
	Ascariasis, clonorquiasis
	Virales:
	Paperas, rubeola, hepatitis (A, B, no-A y no-B) coxsackievirus B, ecovirus, adenovirus, citomegalovirus, varicela, virus de Epstein-Barr, VIH
	Bacterianas:
	Micoplasma, <i>C. jejuni</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. avium complex</i> , legionella, leptospirosis
Anomalías vasculares	Isquemia (hipoperfusión)
	Émbolos ateroscleróticos
	Vasculitis (lupus eritematoso sistémico, poliarteritis nodosa, hipertensión maligna)
Factores miscelánea	Úlcera péptica penetrante
	Enfermedad de Crohn
	Síndrome de Reye
	Fibrosis quística
	Hipotermia

Tabla 3. Causas de la pancreatitis aguda
(Modificado de: Steinberg y cols. 1994)

De nuevo se observan diferencias entre los distintos países respecto a las causas más comunes de la PA: por ejemplo, el factor etiológico más frecuente en Estados Unidos y Finlandia es el abuso en el consumo de alcohol, mientras que en países como Inglaterra, Italia y Grecia, son las afecciones biliares (Stimac y cols., 2012).

1.2.2. Fisiología y fisiopatología del páncreas

Es bien conocida la doble estimulación (neuroendocrina) de la función exocrina pancreática. En la respuesta fisiológica normal, la colecistoquinina (CCK) y la acetilcolina, principalmente, van a unirse a receptores específicos presentes en la superficie de las células acinares induciendo señales transitorias de Ca^{2+} intracelular; éstas serán estimuladoras, a su vez, de la producción de energía mitocondrial en forma de adenosín trifosfato (ATP) y de la exocitosis de los gránulos de zimógeno (Armstrong, 2013). En relación a los factores ambientales como el pH, parece ser que la secreción pancreática causa una acidificación del lumen glandular, que actuaría sobre la misma como regulador *feedback* negativo (Sah y cols., 2012).

Por el contrario, a pesar del creciente interés que en los últimos años ha generado la PA en investigación, poco se sabe de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, dado que los factores que podrían estar implicados en el inicio y desarrollo de la enfermedad parecen formar una red de extrema complejidad.

Desde el punto de vista clínico, se distinguen 3 fases en la PA. En primer lugar, una fase temprana en la que la glándula comienza a estar inflamada debido a la aparición de edema y congestión vascular. Con defunciones por fallo orgánico, esta etapa presenta una tasa de mortalidad aproximada del 35%. La inflamación pancreática puede remitir espontáneamente o repetirse con una intensidad mayor y evolucionar, en la primera semana desde la aparición de los síntomas, a una forma hemorrágica de la enfermedad en la cual la glándula presenta grandes abscesos que pueden volverse necróticos. A las 3-4 semanas culmina esta etapa necrótica (12% de mortalidad), considerada la más peligrosa dado que las bacterias intestinales podrían infectar el páncreas y provocar sepsis (19-37% de mortalidad) (Fantini y cols., 2006). Algunos autores señalan que estas infecciones secundarias pueden tener su origen en la hospitalización del paciente, utilizando como vías de penetración tubos traqueales y catéteres venosos y urinarios (Büchler y cols., 2000). En algunos casos, el pronóstico puede agravarse mediante la diseminación de la inflamación local por el resto del organismo, afectando a órganos tan remotos como el hígado, el cerebro, los riñones y los pulmones. Esta forma severa de la enfermedad recibe el nombre de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (en inglés *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS) y supone un 20% de los casos de PA (Armstrong y cols., 2013).

En relación a la fisiopatología se sospecha que, independientemente de la naturaleza de los agentes causantes de la PA (alcohol, obstrucción biliar, etc.), los mecanismos fisiopatológicos desencadenados son comunes a todos ellos. La mayor parte de los eventos celulares sospechosos de ser responsables de la evolución clínica anteriormente descrita, se conocen mediante la realización de estudios *in vivo*. En la actualidad, existen dos corrientes de pensamiento acerca del posible desencadenante de la inflamación pancreática (Braganza y cols., 2000): por un lado la teoría autodigestiva, en la que la activación prematura de tripsinógeno en tripsina sería la responsable de desencadenar la enfermedad. Dicha activación se produciría por la fusión de gránulos de zimógeno y vacuolas lisosomales, es decir, por la llamada colocalización de tripsinógeno y catepsina B lisosomal. Cabe destacar que este tipo de autofagia, denominada zimofagia, es de naturaleza desconocida. Las evidencias experimentales obtenidas hasta el momento no consiguen determinar si se trata o no de un mecanismo protector frente a la activación prematura de tripsinógeno, debido a la disparidad de resultados. Por otro lado, factores como la acidemia y/o altos y sostenidos niveles de Ca^{2+} intracelular, típicos de la fisiopatología de la PA, parecen ser determinantes en la activación de los zimógenos pancreáticos. En el establecimiento y mantenimiento de estas condiciones ambientales, contribuirían fuentes celulares de Ca^{2+} como el retículo endoplasmático y canales específicos presentes en la membrana plasmática, así como las recientemente identificadas ATPasas vacuolares (vATPasa), encargadas de bombear hidrogeniones (H^+) al interior de las vacuolas lisosomales. Paralelamente, la acidificación del entorno extracelular empeorarían estos mecanismos fisiopatológicos intracelulares y provocarían la disrupción de las uniones intercelulares, facilitando la diseminación de los zimógenos activados a través de los espacios así formados (Sah y cols., 2012). La tripsina escaparía al bloqueo de su inhibidor pancreático y desencadenaría la activación de otras enzimas, con consecuencias parcialmente predecibles. De esta forma, la fosfolipasa A_2 activada degradaría el surfactante pulmonar, y la liberación de lipasa causaría necrosis grasa peripancreática. Asimismo, la activación de otras enzimas por parte de la tripsina provocarían inestabilidad vascular, como sucede con la calicreína (liberadora a su vez de bradiquinina y calidina), la elastasa (degrada los componentes elásticos de los vasos sanguíneos circundantes, contribuyendo a la hemorragia intrapancreática) y el complemento y la kinina, posibles promotores de la diseminación de la coagulación, shock y fallo renal (Steinberg y cols., 1994). Como contrapartida a esta teoría, estudios con animales modificados genéticamente muestran que, si bien la activación del tripsinógeno en tripsina es fundamental para causar daño en el páncreas, la progresión a SIRS sería independiente de este suceso. De hecho, el factor de transcripción nuclear $\text{NF-}\kappa\text{B}$ implicado en la síntesis de mediadores inflamatorios, sería activado por una vía paralela en el tiempo a la explicada anteriormente para la activación de los zimógenos pancreáticos (Sah y cols., 2012).

En los últimos años ha ganado fuerza otra hipótesis que, integrando la activación enzimática como responsable del daño tisular, apunta hacia un estado oxidativo exacerbado

como detonante en la fase inicial, y agravante en etapas más avanzadas de la dolencia. Desde que en la década de los 80 se demostrara la intervención de los radicales libres en la fisiopatología de la PA inducida por ceruleína (Sanfey y cols., 1984; Wisner y cols., 1988), numerosos estudios han corroborado este hecho. Algunos de estos radicales libres, como las especies reactivas de oxígeno (ERO), son productos derivados de la maquinaria mitocondrial de síntesis de ATP. Sin embargo, aún se desconoce si el estrés oxidativo actuaría como agente iniciador o mediador de la cascada de eventos que da lugar a la PA (Closa, 2013). Algunos autores señalan el estrés oxidativo como factor predisponente de la enfermedad, independientemente de la etiología (Park y cols., 2003). Se ha detectado que, en condiciones fisiopatológicas, la sobreproducción de ERO provoca depleción de glutatión reducido (GSH) (Uruñuela y cols., 2002; Tian y cols., 2013) y daño tanto en orgánulos acinares (mitocondria, gránulos de zimógeno, etc.) (Niederau y cols., 1996) como en los principales componentes estructurales (lípidos, proteínas, citoesqueleto, ácido desoxirribonucleico (ADN), etc.) (Jungerman y cols., 1995) de la célula, que derivarían en la activación prematura de las proenzimas. Adicionalmente, parece ser que estos altos niveles de ERO colaborarían en el mantenimiento de los niveles fisiopatológicos de Ca^{2+} , afectando así a la funcionalidad mitocondrial y, por tanto, a la síntesis de ATP, clave en la señalización de necrosis frente a la de apoptosis. Por último, promovería la activación de factores de transcripción como NF- κ B, responsable de la expresión de mediadores pro-inflamatorios. De esta manera, un estado oxidativo no regulado vendría a agravar tanto el daño tisular como la incipiente inflamación local. De hecho, el daño tisular por sí solo valdría para activar a los llamados receptores de patrones moleculares asociados al daño (en inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP), que a su vez induciría la formación de un complejo citosólico denominado inflamasoma, implicado en la cascada de eventos inflamatorios iniciales (Sah y cols., 2013)

Finalmente, y como evento común a las dos teorías, la síntesis de mediadores inflamatorios por parte de las células acinares, mastocitos parenquimáticos y células del endotelio vascular atraerían a más células inmunitarias que contribuirían a la producción de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, etc.), ERO y otras moléculas señalizadoras (óxido nítrico (*NO), factor de agregación plaquetaria (PAF), mieloperoxidasa (MPO), molécula señalizadora intercelular-1 (ICAM-1), endotelina, proteasas y elastasas). El ácido hialurónico y el colágeno que componen la matriz extracelular también resultarían afectados por el creciente estrés oxidativo. Asimismo, ERO podría estimular indirectamente el metabolismo del ácido araquidónico, incrementándose los niveles de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Todo esto confluye en la alteración de la permeabilidad vascular y en la interrupción del flujo sanguíneo, contribuyendo a la aparición de hemorragia, isquemia, necrosis, inflamación y edema. Por tanto, la respuesta inmunitaria local que, en un principio se pone en marcha para hacer frente a la inflamación pancreática, es la que finalmente terminará agravando y

diseminando ese estatus inflamatorio exacerbado al resto del organismo (Rau y cols., 1999; Braganza y cols., 2000; Wu, 2000; Zyromski y cols., 2003; Zhang y cols., 2009). Como se comentó anteriormente, entre los órganos más afectados encontramos el hígado, los riñones, el cerebro y los pulmones. La afección de estos últimos llevan al enfermo de PA a padecer el llamado síndrome de distrés respiratorio (SDR) en adultos, causa principal de muerte en la primera semana. Esta complicación aparece como resultado de la infiltración leucocitaria en el tejido pulmonar que, junto con los macrófagos alveolares, parecen producir altas cantidades de ERO. Existen pruebas de que la xantina oxidasa podría ser la responsable de la diseminación de la inflamación desde el páncreas a los pulmones activando, a su paso por los capilares y en presencia de oxígeno molecular libre, a la P-selectina del endotelio pulmonar (Granell y cols., 2004). Por otro lado, cabe destacar el efecto negativo de ERO y citocinas como TNF- α sobre la permeabilidad intestinal. De hecho, se piensa que la mayor fuente de xantina oxidasa durante la PA es el intestino. Una barrera gastrointestinal alterada es la vía de entrada idónea para bacterias y otros microorganismos oportunistas, que podrían invadir e infectar el páncreas y, posteriormente, provocar sepsis en el individuo (Tian y cols., 2013).

1.2.3. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento

En la actualidad y, en relación a los criterios de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la PA, es patente la falta de homogeneidad que existe en la práctica clínica (Fantini y cols., 2006). Además, tal y como señala Heinrich y cols. (2006), décadas de tratamientos basados en la experiencia profesional más que en evidencias científicas, ha dado lugar a diferencias en la gestión de la enfermedad, en función del centro médico en el que ingrese el paciente.

En la década de los 80, el grupo alemán Ulm sugiere una clasificación de la PA en función de la morfología de la glándula: pancreatitis edematosa parenquimática y necrosis pancreática estéril o infectada (Beger y cols., 1988). Sin embargo, no es hasta 1992 cuando se celebra un simposio en Atlanta (Estados Unidos) (Bradley, 1993) para establecer estándares internacionales relativos a la definición de la enfermedad y sus complicaciones, añadiéndose los términos de gravedad media y severa a la clasificación anteriormente propuesta (Navarro y cols., 2008).

La PA se presenta de forma típica con un dolor abdominal constante que puede radiar a la espalda, acompañado de náuseas y vómitos. Sin embargo, otras manifestaciones atípicas son frecuentes y se necesita realizar un análisis bioquímico (amilasa y lipasa séricas) para confirmar el diagnóstico (Matull y cols., 2006). Durante años, cuando un enfermo de PA ingresaba en el hospital, se utilizaban los criterios clínico-bioquímicos de Ranson (Ranson y cols., 1976) y de Glasgow (Blamey y cols., 1984) para clasificarlo en función de su gravedad, basándose en los datos recogidos entre las primeras 24 y 48 horas de hospitalización. No obstante, para muchos

este tiempo es crucial en el éxito del tratamiento temprano y, además, años después se demostraría que ambos criterios tienen un escaso valor predictivo. De ahí el uso del sistema APACHE-II (*Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation*) (Knaus y cols., 1985), creado en un principio para valorar la gravedad de enfermedades susceptibles de precisar cuidados intensivos y que, posteriormente, se ha extendido para evaluar la gravedad de la PA en las primeras 24 horas. Este sistema tiene en cuenta doce variables fisiológicas (temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria, presión arterial, oximetría, pH arterial, potasio, sodio, creatinina, hematocrito, recuento de leucocitos y nivel de conciencia según la escala de Glasgow), la edad y el estado de salud previo del individuo. Su cálculo diario permite hacer un seguimiento del curso de la pancreatitis (Navarro y cols., 2006). Recientemente, Spitzer y cols. (2006) han propuesto otro sistema clasificatorio llamado BALI, basado en tan sólo cuatro variables (edad y valores sanguíneos de nitrógeno ureico, lactato deshidrogenasa e IL-6) recogidas durante las primeras 48h desde la admisión del paciente y que, según los autores, tendría el mismo valor predictivo que los anteriores. Otros factores pronóstico considerados o propuestos en la evolución de la PA son la endotaxemia (sin bacteriemia) y TNF- α (Exley y cols., 1992), determinación simultánea de lipasa e IL-6 séricas (Pezzilli y cols., 1999), aparición de necrosis, persistencia de fallo orgánico (Johnson y cols., 2004) y valoración de proteína C reactiva, mediadores inflamatorios (IL-1, proteína quimiotáctica de monocitos 1...) y hematocrito (Navarro y cols., 2006; Papachristou, 2008).

Como se comentó anteriormente, el tratamiento para los enfermos de PA varía mucho en función del país y el centro médico, observándose en las tasas de mortalidad diferencias de entre el 10 y el 85%. No obstante, la mayoría de los profesionales coinciden en que el éxito del tratamiento es mucho mayor si se aplica en etapas tempranas de la enfermedad, preferiblemente antes de que transcurran 60 horas desde el comienzo de los síntomas (Neoptolemos y cols., 1998; Fantini y cols., 2006; Navarro y cols., 2008). En general, el tratamiento se basa en la instauración de cuidados de soporte, consistentes en la vigilancia de las constantes vitales del individuo (frecuencia cardíaca y respiratoria, presión arterial y diuresis), así como de la saturación parcial de oxígeno y de la hidratación, siendo ésta última determinante en el desarrollo de sepsis. Del mismo modo, se aplica un tratamiento analgésico y se controla la dieta (baja en grasa) que, en los casos más graves, se suministra mediante nutrición enteral gástrica. Algunas de las fórmulas nutricionales propuestas incluyen suplementos beneficiosos como inmunoestimulantes (arginina, glutamina, ácidos grasos omega-3, vitaminas C y E, betacarotenos), micronutrientes (zinc, selenio y cromo) y probióticos (*L. plantarum*) (Navarro y cols., 2008). Durante el proceso de realimentación, los enfermos de PA alcohólica necesitarán adicionalmente una suplementación enzimática en su dieta (Fantini y cols., 2006). El seguimiento del paciente en las primeras 48 horas es crucial, ya que la severidad de la enfermedad dependerá del desarrollo de complicaciones sistémicas mortales,

como el SIRS y fallo multiorgánico en la primera semana (Figura 3). De forma general, un fallo orgánico persistente durante más de 48 horas supone un aumento de las probabilidades de desarrollar complicaciones, e incluso la muerte del enfermo (50% de los casos) (Johnson y cols., 2004; Navarro y cols., 2006). Clínicamente, se ha comprobado que los enfermos de PA que desarrollan complicaciones presentan niveles de IL-6 e IL-8 superiores a los individuos que no las desarrollan (Norman y cols., 1998; Armengol, 2000). Por tanto, dado que el sistema inmunitario parece ser el principal responsable de éstas, en teoría, el tratamiento temprano con citocinas anti-inflamatorias, anti-citocinas o inhibidores de otros mediadores inflamatorios, prevendrían la aparición de dichas complicaciones (Matull y cols., 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos en diversos estudios y ensayos clínicos son contradictorios al respecto, como los realizados con lexipafant (antagonista de PAF) e infliximab (anticuerpo anti-TNF), y no han arrojado resultados definitivos como para recomendar su uso rutinario en pacientes graves. (Johnson y cols., 2001; Werner y cols., 2005; Fantini y cols., 2006; Chen y cols., 2008).

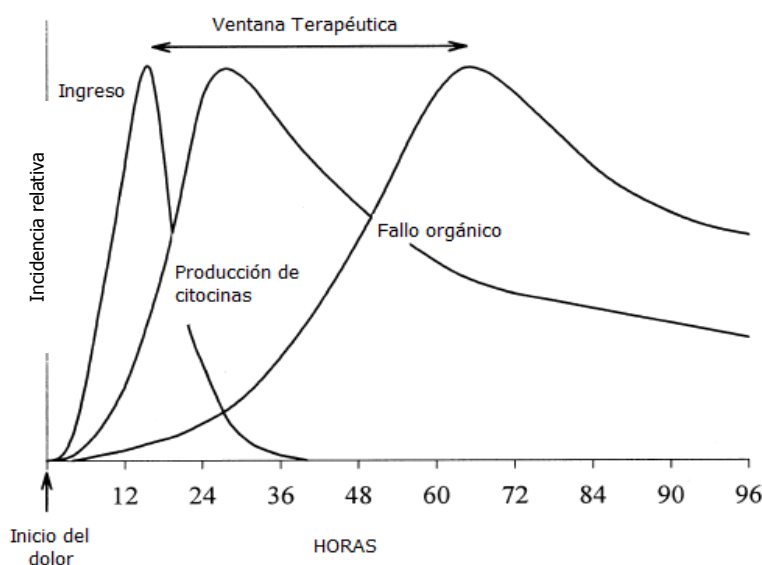


Fig. 3. Curso temporal de la progresión de la PA
(Modificado de Norman y cols., 1998)

En algunos casos, aun no habiendo desarrollado fallo multiorgánico, se hace necesario el traslado de determinados pacientes a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) debido a la gravedad de la PA durante la primera semana de su ingreso. Algunos de los factores a considerar para la identificación de este tipo de pacientes son: impresión clínica, puntuación obtenida mediante sistemas de evaluación de la gravedad, radiografía de tórax (indicadora de derrame pleural) y obesidad (Índice de masa corporal (IMC) > 30), que aumenta el riesgo de gravedad de 2-3 veces (Navarro y cols., 2006). Pasada la primera semana de hospitalización, la mayoría de las muertes (40%) en enfermos de PA se producen por complicaciones locales, siendo la más grave la infección de la necrosis pancreática (Johnson y cols., 2004). En la

actualidad, el uso profiláctico de antibióticos como imipemen y meropenem ha dado algunos resultados experimentales positivos, disminuyendo la incidencia de sepsis y la mortalidad, sin aumentar la incidencia de infecciones fúngicas. Sin embargo, existe una gran controversia respecto al tema y no se puede afirmar categóricamente su eficacia. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurría en el pasado, para aquellos pacientes que desarrollen una necrosis pancreática, sea estéril o infectada (40-70%), es recomendable atrasar lo máximo posible (3-4 semanas) la necrosectomía quirúrgica de la glándula, disminuyendo de este modo la mortalidad y morbilidad asociadas. Se ha observado que la posibilidad de infección, considerado el mayor factor de riesgo en términos de mortalidad y morbilidad en esta segunda etapa de la enfermedad, aumenta en función de la extensión de la necrosis intra y extra-pancreática. Adicionalmente, para prevenir la recurrencia de la PA, se recomienda la extirpación de la vesícula biliar o colecistectomía. Otras complicaciones locales que deben ser tratadas son la aparición de pseudoquistes, abscesos pancreáticos y hemorragia (Büchler y cols., 2000; Werner y cols., 2005; Heinrich y cols., 2006; Navarro y cols., 2006).

La implicación de ERO en la diseminación del estatus inflamatorio exacerbado ha hecho que, en los últimos años, tome fuerza la posibilidad de utilizar moléculas antioxidantes como terapia de la PA. Este aspecto será comentado con más detalle en el apartado 1.3.3.4. Antioxidantes y PA.

1.2.4. Modelos experimentales: Pancreatitis aguda inducida por ceruleína

En las últimas décadas, muchos han sido los modelos experimentales desarrollados *in vivo* e *in vitro* para el estudio de la etiología, fisiopatología y nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento de la PA. Desde un punto de vista práctico, su uso estaría más que justificado por dos razones fundamentales: el páncreas, debido a su localización retroperitoneal, es prácticamente inaccesible para la realización de biopsias en humanos, conllevando una serie de implicaciones éticas y médicas distintas a las planteadas para órganos como el estómago o el colon. Además, los enfermos que acuden al hospital suelen haber superado las etapas iniciales, en las cuales transcurren los eventos celulares de interés científico. Otras ventajas que presenta el uso de modelos animales son la posibilidad de aislar aspectos concretos de la enfermedad, el alto grado de estandarización y reproducibilidad, y la reducción del tamaño de muestra, eliminándose en cierta medida la variabilidad en la población de estudio (Mayerle y cols., 2013).

Como señala Schmidt y cols. (1992) un modelo de pancreatitis ideal debe ser reproducible, imitar la morfología y curso de la enfermedad en humanos y de un grado de

severidad tal que un efecto significativo de un tratamiento sea fácilmente detectable. Asimismo, el daño tisular debe ser substancial como para requerir terapia, pero no tan grave como para que sea tarde aplicarla. De esta forma, los modelos *in vivo* de PA se diferencian en invasivos y no invasivos, tal y como se detalla a continuación (Tabla 4):

No invasivos	Inducción hormonal: ceruleína / toxina de escorpión trinitense Inducción por alcohol Mediada por inmunidad : ovoalbúmina / suero heterólogo / modelos espontáneos de pancreatitis autoinmunes Inducción por dieta (con etionina y deficiente en colina) Bloqueo de genes (IL-1 y TNF- α , IL-6, IL-10, etc.) Inducción por L-arginina
Invasivos	Asa duodenal cerrada: perfusión anterógrada o infusión de varios compuestos en el conducto pancreático / combinación de ácido glicodeoxicólico intraductal con ceruleína intravenosa Inducción vascular: desequilibrio en circulación pancreática / oclusión de arterias o de venas pancreáticas Perfusión anterógrada del conducto pancreático: infusión de varios compuestos en el conducto pancreático / combinación de ácido glicodeoxicólico intraductal con ceruleína / isquemia completa pero reversible del páncreas por oclusión de diferentes arterias usando clips microvasculares Ligación de conductos: conducto biliar distal (a nivel del duodeno) / combinación con estimulación secretora (secretina) / combinación con estimulación secretora y sangre arterial mínima / esfínter de Oddi

Tabla 4. Modelos animales de PA

(Modificado de Zhao y cols., 2013)

Estos modelos están diseñados para generar distinto grado de daño pancreático y diseminación de la inflamación, pudiendo reproducir formas de PA crónica e incluso formas menos frecuentes de la enfermedad, en las que llevar a cabo estudios sobre dolor visceral (Zhao y cols., 2013). En cuanto a los modelos invasivos, a diferencia de los no invasivos, causan necrosis y daño heterogéneo a lo largo de la glándula, por lo que son útiles para el estudio de los eventos fisiopatológicos de la enfermedad, pero no para aquellos encaminados a la aplicación de nuevas medidas terapéuticas (Schmidt y cols., 1992). Por tanto, cabe reseñar que, en la actualidad, ninguno de estos modelos sería completamente satisfactorio en la reproducción íntegra de la enfermedad (Su y cols., 2006).

A finales del siglo XIX, se establece la estimulación colinérgica excesiva como causa de daño pancreático y activación enzimática prematura (Mouret y cols., 1895; Chiari, 1896). En 1977, Lampel y cols. caracterizaron los patrones clínicos y bioquímicos de la PA intersticial,

estableciendo así el modelo experimental de la enfermedad inducida por dosis excesivas de un secretagogo denominado ceruleína, un análogo de la CCK extraído de la rana arborícola australiana *Litoria caerulea* (Mayerle y cols., 2013). A diferencia de lo observado en la estimulación fisiológica por CCK, las primeras investigaciones realizadas en este sentido mostraron que la hiperestimulación por ceruleína provocaba una disminución de la secreción proteica y de la respiración celular, hiperamilasemia, edematización progresiva intersticial, necrosis acinar y grasa, vacuolización, desorganización del citoesqueleto y liberación del contenido vacuolar al espacio extracelular (Watanabe y cols., 1984; Kern y cols., 1985; Saluja y cols., 1985; Niederau y cols., 1985; Jungermann y cols., 1995). En base a estas primeras evidencias científicas, se estableció la teoría autodigestiva de la PA, comentada anteriormente. Como señala Dabrowski y cols. (1999), dado que la hiperestimulación con ceruleína activa a los receptores celulares de CCK, esto podría traducirse en una producción intracelular excesiva de ERO. De hecho, estudios posteriores vendrían a sugerir la implicación de otros factores como el estrés oxidativo y la respuesta inmunitaria, ampliando la compleja red de mecanismos fisiopatológicos implicados en las primeras fases de la enfermedad (Sanfey y cols., 1984; Wisner y cols., 1988; Norman, 1998). En este modelo, las primeras evidencias de daño pancreático comienzan a detectarse a los 15 minutos del inicio de la administración de ceruleína, alcanzando su punto máximo a las 12 horas y resolviéndose espontáneamente a las 24-48 horas (Mayerle y cols., 2013).

La ruta de administración de la ceruleína varía en función del animal usado (en general, roedores) y del grado de severidad que se quiera reproducir, pudiendo aplicarse por infusión intravenosa continua (5-10 µg/ml/h) o mediante inyecciones en la cavidad peritoneal (subcutáneas o intraperitoneales) (Mayerle y cols., 2013). Dentro de los modelos no invasivos, la inducción de PA por inyecciones repetidas de ceruleína es el más utilizado, debido a que es relativamente fácil de llevar a cabo (sin anestesia ni analgesia) y muestra una alta confiabilidad y reproducibilidad. Adicionalmente, se pueden añadir al diseño otros compuestos mediadores de daño tisular (lipopolisacárido y ciclosporina A) y utilizar en animales modificados genéticamente (Zhao y cols., 2013).

Por tanto, a pesar de reproducir una forma autolimitante y de gravedad media de la enfermedad, no representativa del amplio rango de presentaciones clínicas en humanos, el modelo experimental de PA inducida por ceruleína continúa siendo muy recomendable para el estudio de los mecanismos celulares implicados en las primeras fases de la enfermedad como, por ejemplo, el estrés oxidativo (Su y cols., 2006; Armstrong y cols., 2013; Mayerle y cols., 2013).

1.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

La aparición de cantidades significativas de oxígeno molecular (O_2) en la Tierra, modificó radicalmente la vida tal y como había existido hasta el momento. Los organismos anaerobios primitivos desaparecieron o fueron relegados a hábitats donde no existiera el elemento, asegurando así su supervivencia. Probablemente, otros evolucionarían hacia formas de vida que utilizaban el O_2 en la producción eficiente de energía, así como en otras transformaciones metabólicas. Sin embargo, estos nuevos organismos aerobios tendrían que desarrollar un sistema antioxidante capaz de protegerlos frente a los efectos deletéreos del O_2 que, hoy en día, alcanza el 21% de la composición gaseosa de la atmósfera (Halliwell y cols., 1994; Gutteridge, 1995).

In vivo y bajo determinadas circunstancias, el teórico equilibrio entre los niveles prooxidantes y antioxidantes podría romperse a favor de los radicales libres y dar lugar al fenómeno conocido como estrés oxidativo, que provoca graves daños en los principales componentes de la célula y puede desembocar en la aparición enfermedades (Halliwell 1994; Kalyanaraman, 2013).

Por tanto, como señala Halliwell (2009) *"...todos los aspectos de la vida aeróbica involucran radicales libres y antioxidantes – ni podrás escapar de ellos, ni deberías querer hacerlo"*.

1.3.1. Especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres

En los organismos aerobios, además de la radiación ionizante, la obtención de energía mediante la oxidación de substratos ricos en hidrógeno y carbono genera intermediarios reducidos del O_2 , las denominadas ERO. Algunos de ellos, como los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxilo ($\cdot OH$), son altamente reactivos al poseer uno o dos electrones desapareados. No obstante, aunque otros derivados como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y ácido hipocloroso (HOCl) también reciben este nombre, no son verdaderos radicales libres, ya que no poseen la configuración electrónica que define químicamente a estas especies. Adicionalmente, de la reacción de ERO con compuestos como el $\cdot NO$, se originan radicales libres del nitrógeno (ERN) como el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). La reactividad de estos compuestos es tal, que su generación se considera como una cascada de transición entre unas especies y otras (Figura 4) (Halliwell y cols., 1994; Gutteridge, 1995; Brieguer, 2012; Kalyanaraman, 2013).

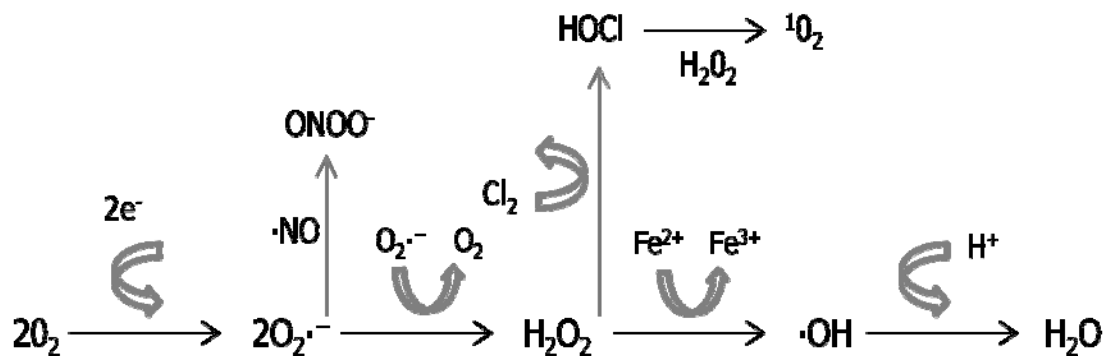


Fig. 4. Reacción en cadena simplificada de producción de ERO y ERN

(Modificado de Brieger y cols., 2012)

La actividad de los radicales libres comenzó a considerarse en la década de los años 30 del pasado siglo, a raíz del proceso de enranciamiento observado en empresas dedicadas al petróleo. Tan sólo unos pocos años después se desarrollaría una próspera industria de producción de los más diversos plásticos basada, precisamente, en la tecnología de los radicales libres. Por el contrario, tuvo que pasar más tiempo para que la Bioquímica Clásica comenzara a aceptar que la actividad de los radicales libres era tan importante y ubicua como la actividad enzimática (Dormandy, 1980).

En los sistemas biológicos, a pesar de poseer una vida media relativamente corta y diferente capacidad de difusión, los radicales libres causan una oxidación selectiva de componentes celulares tan importantes como lípidos, proteínas y ADN. No hay que olvidar que, fisiológicamente, actúan sistémica y celularmente como mensajeros e intermediarios, participando en procesos vitales como el envejecimiento, la regulación de la respuesta inmunitaria o la producción de hormonas tiroideas. La especificidad de la señal dependerá del tipo y cantidad de radical libre, así como de la distribución temporal y espacial (Brieger y cols., 2012). En 1994, Halliwell y cols. sugerían que los radicales libres se generaban mediante dos tipos de procesos: accidentales y deliberados. En el primer caso, determinadas actividades enzimáticas (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa (NOS), ciclooxigenasa, mieloperoxidasa, citocromo P450 microsomal, etc.) y organulares (mitocondria, retículo endoplasmático, peroxisomas...) desencadenarían, directa o indirectamente, la producción de ERO. En el segundo caso, los radicales libres serían producidos y empleados intencionadamente para contraatacar amenazas concretas (producción de $\cdot\text{OH}$, HOCl , H_2O_2 por fagocitos activados) o regular determinadas funciones (vasodilatación mediada por $\cdot\text{NO}$). No obstante, en situaciones patológicas, este contexto oxidorreductor positivo para el organismo evoluciona hacia un entorno hostil para la funcionalidad celular, con repercusiones sistémicas (Brieger, 2012; Kalyanaraman, 2013).

De todos, el radical $\cdot\text{OH}$ es el oxidante más potente, sobre todo en solución acuosa, y puede fácilmente reaccionar con cualquier molécula, como los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana lipídica. Es así como se inicia el fenómeno conocido como lipoperoxidación, una reacción en cadena que continua consumiendo substrato a menos que un antioxidante como la vitamina E (α -tocoferol) sea añadido para terminarla, convirtiéndose él mismo en otro radical (αT^{\cdot}). Parece ser que otros radicales como $^1\text{O}_2$ también provocarían este fenómeno. Los peróxidos lipídicos (LOOH) resultantes son estables a temperatura fisiológica, pero su descomposición es catalizada por metales de transición, como hierro y cobre, dando lugar a aldehídos considerados marcadores de daño oxidativo y detectables a través de la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA), como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). Algunos de estos derivados pueden reaccionar con proteínas y otras macromoléculas inactivándolas, así como mostrar capacidad citotóxica. Sin embargo, también podemos encontrarnos otros subproductos con valor biológico, como los resultantes de la cascada del ácido araquidónico. La lipoperoxidación extensiva de la membrana lipídica provocaría pérdida de fluidez, caída del potencial de membrana, incremento de permeabilidad a H^+ y otros iones e, incluso, rotura membranal con liberación del contenido celular. Adicionalmente, se ha observado que el estrés oxidativo produciría aumentos en los niveles de hierro libre y Ca^{2+} intracelular, causantes de daño oxidativo, así como modificaciones proteicas (formación de grupos carbonilos, ditirosinas y tirosinas clorinadas y nitradas) y mutaciones y fragmentaciones del ADN (Halliwell y cols., 1994; Gutteridge, 1995; Kalyanaraman, 2013). En células acinares, estudios previos realizados *in vitro* han observado la influencia dosis-dependiente del H_2O_2 en la liberación del Ca^{2+} desde los distintos almacenes intracelulares, como la mitocondria (Pariente y cols., 2001; Granados y cols., 2006). Parece ser que las ERO generadas por la actividad de la xantina oxidasa inducirían estos incrementos de la concentración de Ca^{2+} intracelular (González y cols., 2002) que, sostenidos en el tiempo, podrían provocar entre otros fenómenos la disfunción de la mitocondria (Granados y cols., 2005) y la desorganización del citoesqueleto (Rosado y cols., 2002), con la consecuente alteración en el transporte vesicular y la activación prematura de enzimas pancreáticas, precipitando así el resto de mecanismos causantes de daño pancreático.

1.3.2. Sistema de defensa antioxidante

Como se comentó anteriormente, los organismos aerobios han desarrollado un sistema de defensa antioxidante para protegerse de la continua oxidación a la que están sometidos por el mero hecho de existir. Dicho sistema es requerido intra y extracelularmente para mantener la homeostasis del estado oxidativo. Actuando a través de diversos componentes enzimáticos y no enzimáticos, dicho sistema consigue contrarrestar la acción tanto de los pro-oxidantes derivados del metabolismo celular como de aquellos presentes en nuestra dieta (Wahlqvist, 2013). En

conjunto, actuarían a tres niveles posibles: prevención de la formación de radicales libres, intercepción de los mismos y reparación del daño oxidativo generado (Sies, 1993).

En general, las enzimas que componen el sistema antioxidante suponen la principal defensa intracelular. Muchas de ellas son metaloenzimas que dependen de minerales aportados por la dieta para realizar su función. Por ejemplo, la enzima superóxido dismutasa (SOD), que acelera la conversión del radical $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (Figura 5). Existen tres formas de esta enzima, clasificadas en función del metal que actúa como cofactor: las formas que necesitan manganeso (Mn-SOD), presentes en la mitocondria, y las que requieren cobre y zinc (Cu-SOD y Zn-SOD), mayoritariamente en el citosol. Se ha comprobado que la actividad SOD es imprescindible para la vida. Niveles anormalmente altos o bajos de SOD (como los presentes en enfermos de Síndrome de Down, que muestran una disminución en la expresión de las formas Cu-SOD y Zn-SOD, como resultado de una mutación en el gen codificante localizado en el cromosoma 21) dan lugar a efectos deletéreos sobre el organismo (Halliwell, 1994). La enzima SOD también ejerce su función antioxidante de forma indirecta previniendo la liberación de iones de hierro desde los clusters hierro-sulfuro y, por tanto, evitando la descomposición de H_2O_2 en OH^{\cdot} mediada por iones de hierro (reacción de Fenton), así como otros fenómenos mediados por iones metálicos como la lipoperoxidación y la fragmentación de ADN. Por otra parte, entre las enzimas encargadas de la eliminación de H_2O_2 encontramos a la catalasa (CAT) peroxisómica y, a altas concentraciones del radical, a la glutatión peroxidasa (GPx) (Figura 5). Esta última, cuyo centro activo contiene selenio, utiliza el H_2O_2 para oxidar glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). Posteriormente, la enzima glutatión reductasa regenerará GSH desde GSSG, valiéndose de NADPH como fuente de poder reductor. La enzima GPx puede igualmente catalizar la conversión de LOOH en sus correspondientes alcoholes (LOH). Otras enzimas

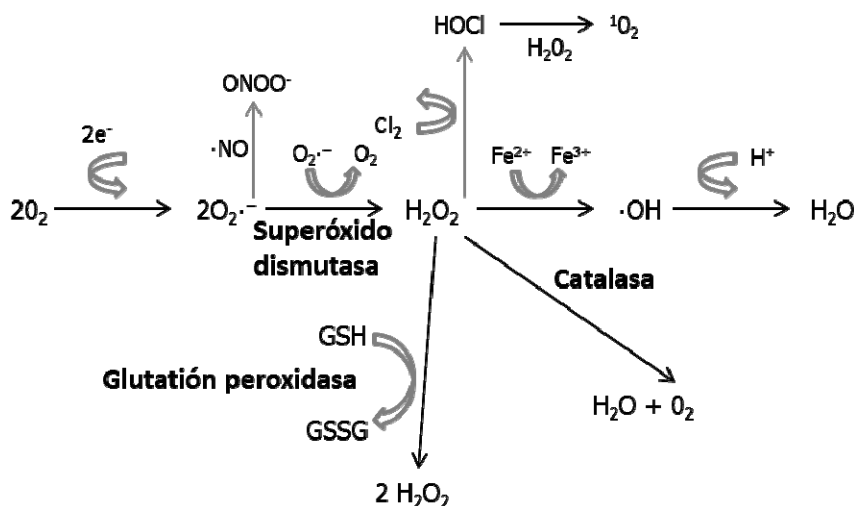


Fig. 5. Enzimas antioxidantes y ERO
(Modificado de Brieger y cols., 2012)

implicadas en la eliminación de ERO son la glutatión peroxidasa dependiente de hidroperóxidos lipídicos y la peroxirredoxina (Sies, 1993; Halliwell, 1994; Kalyanaraman y cols., 2013). La exposición prolongada a un nivel medio de oxidación hace que la célula ponga en marcha mecanismos adaptativos encaminados al restablecimiento del equilibrio oxidantes/antioxidantes. A nivel transcripcional, se basan en la regulación de la expresión y síntesis de las enzimas antioxidantes mencionadas, mediante la ruta de señalización Keap1-Nrf2-ARE, inductora asimismo de otros genes citoprotectores (hemo oxigenasa-1 y quinona oxidorreductasa-1) (Jung y cols., 2010; Kalyanaraman y cols., 2013).

En los fluidos extracelulares, donde no existe esta actividad enzimática antioxidante (aunque se han encontrado formas glicosiladas de SOD y GPx), aparecen moléculas de bajo peso molecular que actúan como *scavengers* o secuestradores de radicales libres. La forma en la que ejercen su capacidad antioxidante, depende de su localización. En general, el más importante es el anteriormente mencionado GSH, que puede directamente neutralizar las especies reactivas o servir de sustrato a la enzima antioxidante GPx. En las membranas, la vitamina E o α -tocoferol sería el *scavenger* más efectivo, finalizando reacciones de lipoperoxidación por secuestro de los radicales peroxilos (LOO^*) formados. De ahí que sea uno de los llamados antioxidantes *rompedores de cadenas*. Otros antioxidantes de importancia a nivel de membrana son el β -caroteno, la vitamina D y la coenzima Q o ubiquinona. En el citosol, la vitamina C (ascorbato) reacciona con diversos radicales libres y regenera αT^* . Extracelularmente, el ácido úrico se considera el mayor antioxidante presente en la sangre de los primates, que ejerce su función junto con otros compuestos como el GSH, la vitamina C, la bilirrubina, el ácido lipoico y los carotenoides. Pero, sin duda alguna, el mejor mecanismo extracelular desplegado para evitar el daño oxidativo es la inactivación de iones metálicos de hierro y cobre por unión con ciertas moléculas transportadoras como la transferrina y lactoferrina, o por la actividad ferroxidasa ejercida por la ceruloplasmina (Halliwell, 1994; Kalyanaraman y cols., 2013; Wahlqvist, 2013).

1.3.3. Antioxidantes dietéticos

Podríamos definir antioxidante como cualquier sustancia que retrasa, previene o inhibe el daño oxidativo de una molécula diana (Halliwell y cols., 2007). La dieta (es decir, los alimentos y bebidas ingeridos diariamente) nos aporta moléculas que, además de tener una capacidad antioxidante intrínseca o formar parte indispensable de determinadas enzimas, actúan como sustratos o suponen un estímulo metabólico para el sistema de defensa antioxidante endógeno (Wahlqvist, 2013). Parece ser que la calidad de la dieta (contenido en

vitaminas, minerales y otros compuestos) contribuiría de diferentes formas al desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

Hoy en día, se considera que los principales antioxidantes presentes en la dieta son las vitaminas (C y E), polifenoles (flavonoides, catequinas, antocianidinas e isoflavonas) y carotenoides. Estudios epidemiológicos corroboran los beneficios que conlleva la ingesta habitual de fruta y verdura sobre nuestra salud, gracias a la actuación sinérgica de sus componentes antioxidantes (Cerqueira y cols., 2007). Por tanto, basándonos en las evidencias científicas actuales, es razonable establecer la recomendación poblacional de adoptar un estilo de vida saludable lo antes posible, consistente en una dieta variada y ejercicio físico, para tener una mayor calidad y esperanza de vida (Charlton, 2002).

Del mismo modo, cabría pensar que la aplicación preventiva y/o terapéutica de estos compuestos antioxidantes en determinadas situaciones patológicas podría ser efectiva, incluyendo aquellas enfermedades cuyas causas se desconocen o carecen de un tratamiento eficaz, como sucede con la PA. En este sentido, se han realizado numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* que, a pesar de obtener resultados prometedores, no nos permiten recomendar definitivamente la aplicabilidad clínica de los antioxidantes dietéticos de origen vegetal.

1.3.3.1. Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Figura 6) fue descubierta por primera vez en la glándula pineal de oveja por el dermatólogo Aaron Lerner en 1958 (Lerner, 1958). Presente en la mayoría de seres vivos, en humanos esta hormona se sintetiza principalmente en la glándula pineal, aunque existen otras fuentes secundarias (retina, intestino, piel, médula ósea, células inmunitarias, etc.) (Claustrat y cols., 2005).

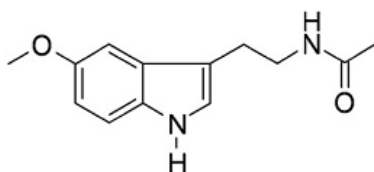


Fig.6. Estructura química de la melatonina
(N-acetil-5-metoxitriptamina)

Considerada la principal neurohormona de la glándula pineal, la melatonina es sintetizada en este órgano a partir de serotonina, procedente a su vez de la transformación del triptófano circulante en el organismo. Con un patrón de secreción dependiente del ciclo luz/oscuridad, se detecta una concentración sérica máxima por la noche (en torno a las 02.00-04.00h de la madrugada) y niveles bajos o indetectables por el día, registrándose asimismo

diferencias intra e interindividuales dependientes de la edad, latitud y época del año. Este patrón circadiano de secreción pineal viene regulado por el reloj biológico presente en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo de mamíferos (Claustrat, 2005; Pandi-Perumal y cols., 2008; Arendt y cols., 2009). Parece que la exposición a luz artificial intensa o a campos de frecuencia electromagnética baja inhibiría su producción, al igual que sucede en determinadas enfermedades en las que se observan patrones anormales de secreción, como es el caso de las patologías oculares, desórdenes neurológicos y enfermedades psiquiátricas y cardiovasculares. En condiciones fisiológicas, el indol recién formado se libera así a los capilares, ejerciendo tanto funciones autocrinas como paracrinas. Debido al carácter anfipático de la molécula, la melatonina es capaz de atravesar las membranas celulares alcanzando diversos fluidos, tejidos y compartimentos celulares. El 90% de la melatonina circulante es metabolizada en el hígado, donde se forma el metabolito urinario 6-sulfatoximelatonina (Claustrat y cols., 2005). Sin embargo, existe otra vía catalítica en la que se lleva a cabo la rotura oxidativa del anillo pirrólico que conforma la molécula, dando lugar a N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinuramina (AFMK), considerado un metabolito activo primario de la melatonina, con capacidad para donar dos electrones (Tan y cols., 2001).

Se ha postulado que, en animales, la función principal de la melatonina pineal sería la de regular los ritmos circadianos (ciclo sueño/vigilia, temperatura corporal, presión sanguínea...) y circanuales (reproducción) o, lo que es lo mismo, mediar la llamada señalización de oscuridad (Handerland y cols., 2008). No obstante, como se señaló anteriormente, existen otras fuentes en el organismo que obligan a revisar las premisas establecidas sobre el papel biológico de la melatonina, reforzando la hipótesis del carácter pleiotrópico de la molécula. Por ejemplo: el sistema gastrointestinal, debido a su extensión, es capaz de sintetizar en las células enterocromoafines entre 400-500 veces más melatonina que la glándula pineal, siendo responsable de los niveles diurnos del indol en sangre. Adicionalmente, se observan diferencias en las concentraciones de melatonina en función del segmento del tracto gastrointestinal estudiado, producción que parece estar igualmente regida por el ciclo luz/oscuridad (Konturek y cols., 2007; Bubenik, 2008). Del mismo modo, en otros órganos la concentración de melatonina es superior a la encontrada en la glándula pineal, bien por captación sanguínea o por producción propia, siendo el patrón típico de secreción poco robusto o inexistente en ellos. El hecho de que, a pesar de su fácil difusión a través de las membranas celulares la melatonina producida extrapinealmente no sea vertida al torrente circulatorio (o lo haga pobremente), demostraría la función protectora del indol en los órganos productores. En los últimos años, diversos estudios señalan, entre otras, las propiedades inmunopotenciadoras, antioxidantes y oncogénicas del indol. Los mecanismos por los que la melatonina ejercería estas funciones aún no están completamente dilucidados. Hasta el momento, se sabe de la existencia de una amplia y variada distribución en el organismo de receptores específicos para la melatonina (MT1 y MT2, acoplados a proteínas G) y también se ha constatado la interacción de la melatonina con

factores de transcripción (NF- κ B), receptores nucleares (RZR/ROR) y proteínas intracelulares (calmodulina y proteínas asociadas a la tubulina) (Claustrat y cols., 2005; Handerland y cols., 2008).

En relación a la función antioxidante de la melatonina, parece ejercerse a distintos niveles y en distintas localizaciones, gracias a su ya mencionada característica anfipática. Por un lado, puede actuar directamente sobre ERO/ERN como molécula *scavenger*, como sucede principalmente con el radical \cdot OH (Tan y cols., 1993; Allegra y cols., 2003). A diferencia de otros antioxidantes clásicos (vitaminas C y E), tras neutralizar a la especie reactiva la melatonina se comporta como un *scavenger* terminal o suicida, que no se recicla en ciclos redox (con el consiguiente consumo de GSH), ni muestra efectos pro-oxidantes, como se explicó anteriormente para α T \cdot . Su eficacia como *scavenger* va a depender de la fase en la que se encuentre (acuosa o lipídica) y se sospecha que es en el anillo aromático rico en electrones, y en los sustituyentes metoxi y acil de la molécula, donde radica su actividad antioxidante (Korkmaz y cols., 2009; Bonnefont-Rousselot y cols., 2010).

Por otro lado, la melatonina también actúa de forma indirecta, estimulando la actividad de las enzimas que conforman el sistema de defensa antioxidante (SOD y GPX), mediante una supuesta regulación epigenética. Las enzimas antioxidantes exhiben un ritmo endógeno bajo condiciones normales de luz/oscuridad, probablemente dependiente de varios factores como el ritmo circadiano de melatonina, la duración de la exposición a ésta, la presencia endógena del indol y la sensibilidad funcional de los receptores específicos (Rodríguez y cols., 2004; Pandi-Perumal y cols., 2008). Adicionalmente, se ha detectado que la melatonina regula la actividad de otras enzimas implicadas en el mantenimiento del estado oxidativo, inhibiendo a enzimas pro-oxidantes como la óxido nítrico sintasa y activando a enzimas de síntesis y reciclaje de GSH como la γ -glutamilcisteína sintetasa y glutatión reductasa (Bonnefont-Rousselot y cols., 2010). Como señala Handerland y cols., (2008) es importante prestar atención al hecho de que, al coordinar y temporalizar los ritmos biológicos, la melatonina también evitaría la producción de radicales libres, como se deriva de estudios realizados con distintos modelos experimentales de mutantes de genes reloj, en los que se observa un estrés oxidativo marcado. Por otra parte, el comprobado efecto antiexcitatorio/antiexcitotóxico del indol atenuaría la producción de ERO/ERN resultante de la actividad metabólica y prevendría del estrés celular causado por Ca^{2+} y \cdot NO. En este contexto, cobra especial relevancia la mitocondria. Se ha constatado que, en células sanas, este orgánulo estaría especialmente protegido por la melatonina a través del mantenimiento del flujo de electrones, la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, el potencial de membrana (Xu y cols., 2002; Espino y cols., 2011) y la producción de ATP, así como la prevención de apoptosis por inhibición directa del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (Sourdeval y cols., 2006; Espino y cols., 2010), entre otros mecanismos. Sin embargo, se ha observado que en líneas tumorales como la línea celular de leucemia

promielocítica humana HL-60, la melatonina exhibe propiedades opuestas a las comentadas para células sanas, siendo capaz de incrementar los efectos apoptóticos de compuestos como H₂O₂ a través de mecanismos dependientes de la mitocondria (Bejarano y cols., 2009; Bejarano y cols., 2011b). Asimismo, en otro tipo de células tumorales la melatonina podría actuar estimulando la producción intracelular de ERO, lo cual produce una citotoxicidad significativa y la activación de caspasas (Bejarano y cols., 2011)

Por último, la capacidad inmunomoduladora de la melatonina supondría otra línea de defensa frente al estrés oxidativo. El indol es capaz de interactuar directamente con los órganos linfoides y determinadas células inmunitarias, vía MT1 y MT2. Adicionalmente, algunos leucocitos (monocitos, eosinófilos, células cebadoras y *natural killer* (NK)...) producen *per se* melatonina. Así, a través de los distintos niveles de actuación, la melatonina contribuiría por un lado a la atenuación de las señales proinflamatorias y, por otro, a la promoción de mecanismos antiinflamatorios. Se sospecha que la interacción entre el sistema inmunitario y la melatonina sería bidireccional, dado que ciertas citocinas (como el interferón γ (IF- γ)) afectan a la síntesis y liberación del indol. Por tanto, la melatonina funcionaría como enlace funcional entre los sistemas neuroendocrino e inmunohematopoyético (Claustrat y cols., 2005; Handerland y cols., 2008).

En los últimos años, se ha descubierto la presencia de melatonina en las diferentes estructuras (hojas, frutas y semillas) de especies vegetales consumidas habitualmente (tal y como se detalla en la Tabla 5), donde también tendría un efecto protector frente al estrés oxidativo. Por ejemplo, se cree que en semillas la función de la melatonina es la de proteger frente al daño oxidativo derivado de la exposición a luz ultravioleta, variaciones de temperatura y toxinas ambientales (Garrido y cols., 2014).

Fuente	Contenido en melatonina (ng/g)
Almendra	39,9
Altramuz (raíz)	16,2-18,4
Arroz	1
Banana	0,5
Café	11,5x10 ⁴
Cereza ácida	2-15
Cereza dulce	0-0,2
Girasol	29
Maíz	1,3
Manzana	4,8x10 ⁻²
Mostaza blanca	189
Nuez	3,5
Tomate	1,1
Uva (piel)	0,5x10 ⁻² -0,9

Tabla 5. Fuentes dietéticas y contenido de melatonina

(Modificada de Garrido y cols., 2014)

De este modo, la melatonina pasaría a engrosar la lista de compuestos dietéticos con propiedades antioxidantes que suponen un beneficio para nuestra salud en general, y para nuestro estado oxidativo, en particular. Consecuentemente, su aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades es objeto de estudio en nuestros días. Los detalles sobre la suplementación con melatonina serán desarrollados en el apartado 1.4. "Suplementación antioxidante y pancreatitis aguda".

1.3.3.2. Resveratrol

El resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol estilbeno producido por más de 70 especies vegetales distintas, actuando como fitoalexina en respuesta a estrés ambiental o a patógenos. Compuesto por dos anillos aromáticos unidos por un puente metileno (Figura 6), fue aislado por primera vez en 1939 por el doctor Takaoka a partir de la raíz de la planta *Veratrum glandiflorum*, e identificado posteriormente en *Polygonum cuspidatum* (Nonomura y cols., 1963), planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional oriental para el tratamiento de diversas dolencias como procesos inflamatorios, carcinogénesis y enfermedades cardiovasculares (Pervaiz y cols., 2003; Catalgol y cols., 2012; Nakata y cols., 2012).

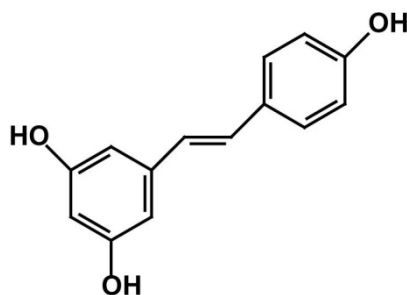


Fig. 6. Estructura química del resveratrol
(trans-3,4',5'-trihidroxiestilbeno)

El resveratrol comenzó a despertar un mayor interés entre la comunidad científica a raíz de la divulgación de la llamada *Paradoja Francesa* (Renaud y cols., 1992). Este término aparece por primera vez tras el análisis de los datos epidemiológicos correspondientes a la población francesa, recogidos dentro de un proyecto internacional promovido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 1989). En Francia, al comparar con otros países industrializados como Estados Unidos o Reino Unido, se observó una baja incidencia de enfermedades coronarias entre la población, a pesar del consumo generalizado de una dieta rica en ácidos grasos saturados y niveles de colesterol similares a los del resto de países. Entre las hipótesis que surgieron destacó la propuesta de Renaud y cols. (1992), que veían en el consumo moderado de vino (en torno al 57% del total de bebidas alcohólicas consumidas), rico

en resveratrol, la explicación a estas llamativas discrepancias entre países. Estudios posteriores vendrían a identificar y corroborar experimentalmente el protagonismo del resveratrol en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Catalgol y cols., 2012).

El resveratrol se encuentra principalmente en la uva (sobre todo en la piel) y el cacahuete, entre otros alimentos. Presenta dos formas, *cis* y *trans*, siendo esta última la más bioactiva. Al ser metabolizado, da lugar a una serie de conjugados entre los que se encuentran formas glucuronadas y sulfatadas. Asimismo, la citocromo P450 CYP1B1, enzima sobreexpresada en una amplia variedad de tumores humanos y catalizadora de reacciones de hidroxilación aromática, metaboliza resveratrol en un derivado antitumoral denominado piceanato (Potter y cols., 2002). Tras su ingestión, parece ser que la biodisponibilidad del estilbeno depende en gran medida de la llamada matriz alimenticia, es decir, del resto de componentes nutricionales que lo acompañen (proteínas, hidratos de carbono, grasas, fibra, alcohol, etc.). De hecho, se ha observado que la transformación de resveratrol en los conjugados mencionados, es inhibida por la presencia de otros polifenoles, especialmente la quercetina. Existen evidencias de acumulación preferente del polifenol en hígado y riñones. A diferencia de los conjugados, no se ha detectado la presencia de resveratrol libre en suero ni en orina (Cucciolla y cols., 2007; Catalgol y cols., 2012).

Su actividad biológica radica en el número y posición de determinantes estructurales como grupos carboxilos, en las uniones de hidrógeno intramoleculares, en la estereoisomería y en la presencia de dobles enlaces. Asimismo, la existencia de anillos aromáticos en su estructura le confiere propiedades antioxidantes, secuestrando radicales $\cdot\text{OH}$ (por ejemplo, en reacciones de Fenton) e interceptando reacciones de lipoperoxidación. Al igual que la melatonina, estimula de forma indirecta la actividad del sistema enzimático antioxidante. Sin embargo, se ha observado que, a bajas concentraciones y/o en presencia de iones de cobre, también puede actuar como pro-oxidante, lo que lleva a pensar que el resveratrol actúa de un modo u otro en función de la dosis y el tipo celular (Pervaiz y cols., 2003; Cucciolla y cols., 2007; Catalgol y cols., 2012). Sin embargo, dicho papel pro-oxidante no tiene por qué ser nocivo para la salud: concentraciones farmacológicas de resveratrol mejorarían la biodisponibilidad de $\cdot\text{NO}$ y, por tanto, la homeostasis cardiovascular, por mecanismos aún no establecidos (Rush y cols., 2007).

Por otro lado, el resveratrol también exhibe propiedades inmunomoduladoras, inhibiendo distintas fases de la respuesta inflamatoria, desde el reclutamiento inicial de polimorfonucleares para su activación, hasta la liberación de mediadores proinflamatorios. En este sentido, se ha constatado que el estilbeno es capaz de bloquear las rutas de síntesis de mediadores proinflamatorios (eicosanoides, prostaglandinas y tromboxanos) catalizadas por las enzimas ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa (LOX). De este modo, prevendría de los efectos de

dichos mediadores, que actúan como quimioatrayentes, activadores de agregación plaquetaria y señalizadores de la liberación de histamina por los basófilos, así como promotores de la carcinogénesis. Adicionalmente, el resveratrol podría llevar a cabo su actividad anti-inflamatoria mediante regulación génica, muy probablemente a nivel de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. En condiciones fisiológicas, ambos estimularían la expresión de las enzimas NOS inducible (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX2), participantes de procesos inflamatorios y carcinogénicos, y que son a su vez inhibidos por el polifenol en estudios *in vitro* (Pervaiz y cols., 2003; Cucciolla y cols., 2007; Nakata y cols., 2012).

Por último, es importante señalar los efectos antitumorales (a niveles de iniciación, promoción y progresión, así como angiogénesis y metástasis) y antienvjecimiento atribuidos al resveratrol (Catalgol y cols., 2012). Si bien no se conocen completamente los mecanismos por los cuales el estilbeno podría ejercer estas propiedades, se piensa que la clave estaría en la interacción con enzimas como la sirtuina 1 (SIRT1), quinona reductasa 2 (QN2) y proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMP) (AMPK), así como con los factores de transcripción Nfr2, NF- κ B y AP-1 (Nakata y cols., 2012). Además de inducir mecanismos apoptóticos con mediación mitocondrial (Pervaiz y cols., 2003), parece ser que la aplicación de resveratrol en modelos experimentales de envejecimiento y síndromes metabólicos provocaría un incremento en la biogénesis mitocondrial. Dicho fenómeno también ha sido registrado en experimentos de restricción calórica, condición que ha mostrado ser eficaz en contrarrestar el proceso de envejecimiento orgánico (Ungvari y cols., 2011). En conjunto, la relación mitocondria-resveratrol podría prevenir de la producción de radicales libres y ayudar al mantenimiento de un estado oxidativo óptimo para el funcionamiento celular, relacionando asimismo este mecanismo de acción con las capacidades antioxidante e inmunorreguladoras del resveratrol.

1.4 SUPLEMENTACIÓN ANTIOXIDANTE Y PANCREATITIS AGUDA

Como se comentó anteriormente, una dieta rica en frutas y verduras aporta al organismo una serie de compuestos antioxidantes que ayudan a mantener un estado oxidativo óptimo para su buen funcionamiento siendo, por tanto, beneficiosos para la salud en general. En las plantas, algunos de estos componentes son producidos en respuesta a situaciones de estrés, confiriendo asimismo protección antioxidante a los animales que los consumen, según el principio biológico conocido como xenohormesis (Veskouskis y cols., 2012). En humanos, los datos epidemiológicos relacionan el consumo de alimentos ricos en antioxidantes con una mayor calidad y esperanza de vida. De ahí que, en las últimas décadas, hayan surgido grandes expectativas en relación a la aplicación de estos antioxidantes dietéticos en el tratamiento de enfermedades de la más diversa índole, sobre todo, aquellas que implican procesos oxidativos (Cerqueira y cols., 2007).

La participación contrastada del estrés oxidativo y de la respuesta inflamatoria en la fisiopatología de la PA, así como la falta de una terapia eficaz, se ha traducido en las últimas décadas en una intensa investigación en relación a la aplicación de diversos antioxidantes como tratamiento preventivo y/o terapéutico.

Resumiendo lo comentando sobre el protagonismo del estrés oxidativo en la PA, entre las posibles fuentes de ERO/ERN en las células acinares estarían la xantina oxidasa, citocromo P450, NADPH oxidasa y la mitocondria. Adicionalmente, las células inmunitarias atraídas por el daño pancreático, contribuirían a la producción de estos radicales libres y, por tanto, al daño tisular. Como consecuencia del ataque de los mismos sobre orgánulos y componentes esenciales de las células acinares, surgen fenómenos como la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, desorganización del citoesqueleto, daños en el ADN y autodigestión, al igual que depleción de los mecanismos endógenos de defensa antioxidante, tanto enzimáticos (SOD, GPx, CAT, etc.) como no enzimáticos (GSH, vitaminas A, C y E y selenio) y la inducción de determinados genes, comentados en detalle anteriormente. Extracelularmente, ERO/ERN provocaría un aumento de la permeabilidad vascular, con interrupción del flujo sanguíneo, contribuyendo a la aparición de hemorragia, isquemia, necrosis, inflamación y edema. Por tanto, en base a las evidencias experimentales, se especula sobre si las complicaciones sistémicas que determinan la severidad de la PA no serían también debidas a estas especies reactivas, producidas principalmente por neutrófilos activados (Closa, 2013), al igual que sucedería con el dolor (Eşrefoğlu, 2012).

Consecuentemente, en relación a la participación de ERO/ERN en la PA, se han estudiado los efectos que distintos compuestos antioxidantes ejercen sobre diversos modelos

experimentales de la enfermedad. Entre ellos, se ha probado la suplementación con vitaminas (C y E), β -caroteno, selenio, eucaliptol (Lima y cols., 2013), quercetina (Carvalho y cols., 2010), licopeno (Özkan y cols., 2013) y catequinas, bien en solitario (monoterapia) o en combinación con otros antioxidantes, con resultados dispares y, en algunos casos, con marcada tendencia pro-oxidante (Eşrefoğlu, 2012; Armstrong y cols. 2013; Closa, 2013).

La melatonina, presente a diferentes concentraciones en gran variedad de productos vegetales (Tabla 5), comenzó a utilizarse como suplemento para el tratamiento de trastornos del sueño, como el insomnio y el *jet lag*. En los últimos años, numerosos estudios han demostrado los efectos beneficiosos de la melatonina frente enfermedades inflamatorias, cardíacas y neurológicas (Alzheimer, Parkinson, depresión, etc.), distintos tipos de cáncer, diabetes, obesidad, daño celular consecuencia de intervenciones quirúrgicas, patologías neonatales (asfixia, sepsis, etc.) e infertilidad, entre otros. En individuos sanos, la administración oral con dosis suprafisiológicas de melatonina incrementa de forma proporcional la concentración del indol en sangre, no presentando efectos adversos. Actualmente, se especula sobre si existe efecto sinérgico con otros compuestos contenidos en productos vegetales y si la cantidad ingerida a través de ellos es suficiente para dar niveles plasmáticos adecuados para causar efectos beneficiosos. Dado que la síntesis pineal de melatonina disminuye con la edad, la suplementación en ancianos debería ser considerada en un futuro próximo para la sincronización temporal del organismo en esta fase de la vida (Arendt y cols., 2009; Bonnefont-Rousselota y cols., 2010).

De cara a la suplementación en la PA, no podemos desestimar la función pancreatoprotectora de la melatonina endógena. Existe una clara relación entre la producción pineal del indol y la gravedad de la PA, como demuestra un estudio de extirpación de la glándula pineal (pinelectomía) en ratas. En este experimento, la administración exógena de melatonina revirtió los parámetros alterados por la inducción experimental de la enfermedad (Jaworeck y cols., 2010). Asimismo, en un ensayo clínico realizado por Belyaev y cols. (2011), las concentraciones del indol en pacientes de PA menores de 35 años aparecieron elevadas en las primeras 24 horas del comienzo del dolor abdominal. Teniendo en cuenta que los niveles de melatonina en sangre son superiores durante la noche que durante el día, es evidente que dichos niveles nocturnos debían ser suficientes para ejercer un efecto protector sobre la inflamación pancreática. De igual modo, parece existir una actividad superior de enzimas antioxidantes como SOD durante la noche (Jaworek y cols., 2004). Una vez en el torrente circulatorio, el ya comentado carácter anfipático de la melatonina le permitiría acceder a multitud de tejidos, líquidos biológicos y compartimentos celulares, ejerciendo funciones específicas sobre ellos. En la PA es probable que la melatonina, tanto endógena como exógena, actúe a varios niveles: como *scavenger* de radicales libres, estimuladora de las defensas antioxidantes, moduladora de la respuesta inmunitaria, inhibidora de la infiltración leucocitaria y

promotora de la apoptosis de neutrófilos activados, limitando así la progresión de la enfermedad (Chen y cols., 2005). Por otro lado, una de las dianas celulares en las que podría influir principalmente la melatonina sería la mitocondria, estabilizando su correcto funcionamiento frente a la situación patológica en desarrollo y, por tanto, decidiendo el destino celular entre la apoptosis y la necrosis.

Por otro lado, la suplementación con resveratrol está ganando fuerzas en los últimos años debido, asimismo, a los prometedores resultados experimentales que podrían llegar a ser extrapolados a la clínica, como el tratamiento de multitud de desórdenes sistémicos en los que interviene la respuesta inflamatoria (Pervaiz y cols., 2003). Entre otras aplicaciones terapéuticas, el resveratrol podría ser utilizado frente a distintos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurológicas (Alzheimer, epilepsia, etc.), obesidad y diabetes tipo 2 (Vang y cols., 2011). Al igual que en la suplementación con melatonina, surgen incógnitas relacionadas con la dosis, el metabolismo y la toxicidad del resveratrol. Los estudios de quimioprevención de cáncer realizados *in vitro* muestran que el resveratrol es efectivo a concentraciones de 10-100 μM . Sin embargo, a la hora de trasladar la experiencia para la realización de ensayos clínicos, surge la cuestión de cuáles son la dosis y la administración temporal adecuadas para alcanzar en los órganos afectados los niveles necesarios. Además, se ha constatado una rápida metabolización del resveratrol a formas glucuronadas y sulfatadas, desconociéndose aún su bioactividad (Gescher y cols., 2003). En teoría, la reformulación biotecnológica del resveratrol supondría una mayor solubilidad y menor transformación metabólica del compuesto, mejorando su biodisponibilidad (Chachay y cols., 2011). Otra cuestión relacionada es determinar el nivel sérico de resveratrol que se alcanzaría tras su consumo. Teniendo en cuenta que el contenido en vino tinto es de aproximadamente 5 mg/kg y, suponiendo consumo de 250 ml/día por una persona de 70 kg, tendríamos una concentración de 18 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, insuficiente para alcanzar niveles considerados eficaces *in vitro*. Asimismo, en la suplementación con resveratrol deberíamos prestar atención a la dualidad del resveratrol en función de la dosis porque, tal y como ya señalaba en el siglo XVI el científico suizo Paracelso (1493-1541) "*La dosis correcta diferencia a una droga de un remedio*" (Kalyanaraman y cols., 2013). Por último, en relación a los efectos secundarios observados por suplementación con resveratrol hasta la fecha, si éstos aparecen son de carácter medio y reversibles, como dolor de cabeza, náuseas y diarrea, y no se ha registrado ninguna alteración en los parámetros bioquímicos, neurológicos o electrocardiográficos analizados (Vang y cols., 2011). Precisamente, esta inocuidad lo convertiría en un candidato ideal a coadyuvante de tratamientos frente al cáncer como la radioterapia, minimizando los efectos nocivos derivados de la misma (Catalgol y cols., 2012).

Los efectos beneficiosos ejercidos por el resveratrol sobre la PA comienzan a ser analizados y hasta el momento existen poco estudios publicados, en comparación con las numerosas experiencias llevadas a cabo con otros antioxidantes. Sin embargo, en función de lo

que se conoce hasta el momento, el resveratrol parece actuar de forma similar a como lo hace melatonina, tanto intracelularmente como extracelularmente. Como se comentó anteriormente, la existencia de anillos aromáticos en su estructura le confiere propiedades antioxidantes, secuestrando radicales $\cdot\text{OH}$ (por ejemplo, en reacciones de Fenton) e interceptando reacciones de lipoperoxidación, lo cual podría evitar fenómenos oxidativos estructurales. Asimismo, el resveratrol exhibe propiedades inmunomoduladoras a través de la inhibición de distintas fases de la respuesta inflamatoria (reclutamiento, activación e infiltración leucocitaria, agregación plaquetaria, síntesis y liberación de mediadores proinflamatorios, etc.) y mediante regulación génica, muy probablemente a nivel de los factores de transcripción NF- $\kappa\beta$ y AP-1 (Pervaiz y cols., 2003). Adicionalmente, el resveratrol podría contribuir a la biogénesis y estabilidad mitocondrial (Ungvari y cols., 2011), mejorando el pronóstico de la PA.

Pese a todo lo anteriormente expuesto, no se ha obtenido el éxito esperado en la suplementación con antioxidantes aislados, si se compara con los efectos significativos obtenidos en determinadas patologías por la ingesta de dietas saludables como la mediterránea. En conjunto, los resultados obtenidos *in vivo* sugieren que la suplementación antioxidante sería eficaz en la prevención y/o reducción de la progresión de la PA, siempre y cuando se aplique antes del comienzo de la enfermedad. Este sería el mayor impedimento en relación a la traslación a la práctica clínica, donde el paciente ingresa aquejado ya de la dolencia y en una fase indeterminada de la misma. Adicionalmente, parece ser que los roedores (ratones y ratas) utilizados en los estudios *in vivo* pudieran ser más sensibles al efecto de los antioxidantes dietéticos que los humanos (Veskouskis y cols., 2012). Cabe destacar que la dosis, el tiempo de administración y la confluencia con otros compuestos podrían ser factores determinantes en el éxito de la suplementación antioxidante. Es probable que exista una sinergia entre los distintos componentes presentes en los alimentos que se traduzca, finalmente, en los beneficios observados sobre la salud. Esta idea queda resumida en la afirmación realizada por Halliwell (2000): "*Un efecto protector de la dieta, no es equivalente a un efecto protector de los antioxidantes de la dieta*". Por otro lado, que un antioxidante funcione como preventivo no implica que sea igualmente eficaz frente a otra etapa de la enfermedad. La administración de antioxidantes después de la aparición de daño oxidativo podría promover posteriores efectos nocivos, actuando en este caso como potentes oxidantes. Además, se desconocen los efectos que, sobre la expresión de genes que codifican para las defensas antioxidantes y otros mecanismos sistémicos, provoca la suplementación con antioxidantes exógenos (Cerqueira y cols., 2007; Brieguer y cols., 2012).

Por tanto, a pesar de los avances en esta área, los resultados experimentales obtenidos *in vitro* e *in vivo* continúan siendo limitados e insuficientes para concluir el uso generalizado de antioxidantes tanto en condiciones normales como patológicas, además de no considerar la

variación de las necesidades dietéticas en función del estado fisiológico del individuo (ancianos, atletas...) (Cerqueira y cols., 2007). Como señala Strand (1999), *“Un sistema in vivo podría ser caracterizado como interesante desde el punto de vista biológico pero inaccesible desde el punto de vista experimental, mientras que el correspondiente sistema in vitro podría ser definido como un sistema experimentalmente accesible pero biológicamente menos interesante”*. Por todas estas razones, son necesarios más estudios que ayuden a responder las incógnitas que, en relación a la suplementación antioxidante en humanos, permanecen aún sin respuesta.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La pancreatitis aguda (PA) es una enfermedad de carácter inflamatorio cuya manifestación clínica puede variar entre formas de carácter medio y autolimitante, y formas de pronóstico grave, donde el paciente puede llegar a morir en pocos días debido a la aparición de complicaciones locales y/o sistémicas (Wu, 2000; Werner y cols., 2005). Los cálculos biliares y el abuso en la ingesta de alcohol son las causas más comunes de la enfermedad, suponiendo alrededor del 80% de los casos (Armstrong y cols., 2013). Si bien las altas tasas de mortalidad han disminuido en los últimos años gracias a diversos factores, la PA continúa siendo un problema socio-económico para los sistemas de asistencia sanitaria de todo el mundo.

A pesar del creciente interés que en los últimos años ha generado la PA en investigación, poco se sabe de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la enfermedad, dado que los factores que podrían estar implicados en el inicio y desarrollo de la enfermedad parecen formar una red de extrema complejidad. Se sospecha que, independientemente de la naturaleza de los agentes causantes de la PA (alcohol, obstrucción biliar, etc.), los mecanismos fisiopatológicos desencadenados son comunes a todos ellos.

En la actualidad, existen dos corrientes de pensamiento acerca del posible desencadenante de la inflamación pancreática (Braganza y cols., 2000). Durante años se ha defendido que la activación prematura de las enzimas digestivas de origen pancreático sería la responsable de desencadenar la enfermedad, en la llamada teoría autodigestiva. Sin embargo, en los últimos años ha ganado fuerza otra hipótesis que, integrando la activación enzimática como responsable del daño tisular, apunta hacia un estado oxidativo exacerbado como detonante en la fase inicial, y agravante en etapas más avanzadas de la dolencia. La exposición de los acinos pancreáticos a niveles elevados y mantenidos en el tiempo de estrés oxidativo supone la aparición de fenómenos estructurales nocivos para la integridad celular y, por tanto, para la integridad glandular. Finalmente, y como evento común a las dos teorías, la síntesis de mediadores inflamatorios por parte de las células acinares, mastocitos parenquimáticos y células del endotelio vascular atraerían a más células inmunitarias que contribuirían a la producción de citocinas, ERO y otras moléculas señalizadoras. Todo esto confluye en la alteración de la permeabilidad vascular y en la interrupción del flujo sanguíneo, contribuyendo a la aparición de hemorragia, isquemia, necrosis, inflamación y edema. Por tanto, la respuesta inmunitaria local que, en un principio se pone en marcha para hacer frente a la inflamación pancreática, es la que finalmente terminará agravando y diseminando ese estatus inflamatorio exacerbado al resto del organismo (Rau y cols., 1999; Braganza y cols., 2000; Wu, 2000; Zyromski y cols., 2003; Zhang y cols., 2009).

Consecuentemente, la participación contrastada del estrés oxidativo y de la respuesta inflamatoria en la fisiopatología de la PA, así como la falta de una terapia eficaz, se ha traducido

en las últimas décadas en una intensa investigación en relación a la aplicación de diversos antioxidantes como tratamiento preventivo y/o terapéutico. Es bien conocido que una dieta rica en frutas y verduras aporta al organismo una serie de compuestos antioxidantes que ayudan a mantener un estado oxidativo óptimo para su buen funcionamiento siendo, por tanto, beneficiosos para la salud en general. No obstante, pese a los esfuerzos realizados, no se ha obtenido el éxito esperado en la suplementación con antioxidantes aislados, si se compara con los efectos significativos obtenidos en determinadas patologías por la ingesta de dietas saludables como la mediterránea. De ahí que surja la necesidad de realizar más estudios que permitan continuar avanzando en el conocimiento actual sobre la influencia de los antioxidantes en la salud humana en general, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas.

Por todo lo anteriormente expuesto, el **Objetivo General** de la presente Tesis Doctoral ha sido evaluar el efecto quimiopreventivo de antioxidantes (melatonina y resveratrol) en un modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en rata Wistar.

Este Objetivo General ha sido desglosado en los siguientes **Objetivos Específicos**:

1. Analizar el efecto quimiopreventivo de la administración exógena de melatonina sobre los fenómenos sistémicos de desintegración glandular, activación y liberación prematura de enzimas pancreáticas (amilasa y lipasa), estado oxidativo (corticosterona y capacidad antioxidante total) y respuesta inflamatoria (IL-1 β , TNF- α e IL-4), durante el proceso de inducción de la pancreatitis aguda con ceruleína.
2. Estudiar la influencia de la suplementación preventiva con melatonina sobre el daño oxidativo tisular (lipoperoxidación y oxidación proteica), cuantificando asimismo los niveles de defensas antioxidantes endógenas en el páncreas (glutatión peroxidasa y capacidad antioxidante total) durante el proceso de inducción de la pancreatitis aguda con ceruleína.
3. Determinar los efectos quimiopreventivos de la suplementación con resveratrol sobre fenómenos sistémicos y locales como la desintegración glandular, activación y liberación prematura de enzimas pancreáticas (amilasa y lipasa), estado oxidativo a nivel sérico (corticosterona y capacidad antioxidante total) y tisular (lipoperoxidación), respuesta inflamatoria (IL-1 β e IL-10), defensas antioxidantes pancreáticas (glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) y señal de calcio intracelular, durante el proceso de inducción de la pancreatitis aguda con ceruleína.

2. JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS

A pancreatite aguda (PA) é uma doença inflamatória cuja manifestação clínica varia entre formas de caráter médio e autolimitante, e formas de prognóstico grave, onde o doente pode chegar a morrer em poucos dias pela aparição de complicações locais e/ou sistémicas (Wu, 2000; Werner y cols., 2005). Os cálculos biliares e o abuso na ingestão de álcool são as causas mais comuns da doença, envolvendo cerca de 80% dos casos (Armstrong y cols., 2013). Embora as elevadas taxas de mortalidade tenham diminuído nos últimos anos por causa de diversos fatores, a PA continua a ser um problema socio-económico para os sistemas de cuidados de saúde do mundo inteiro.

Apesar do crescente interesse que a PA tem gerado nos últimos anos, sabemos pouco sobre os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à doença, dado que os fatores que podem estar envolvidos na aparição e desenvolvimento da doença parecem formar uma rede de extrema complexidade. Suspeita-se que, independentemente da natureza dos agentes causadores da PA (álcool, obstrução biliar, etc.), os mecanismos fisiopatológicos desencadeados são comuns a todos eles.

Atualmente, existem duas correntes de pensamento sobre o possível desencadeante da inflamação pancreática (Bragança et al., 2000). Durante anos, tem-se argumentado que a ativação prematura das enzimas digestivas de origem pancreática seria a responsável por desencadear a doença, na chamada teoria autodigestiva. No entanto, nos últimos anos ganhou força outra hipótese que, integrando a ativação enzimática responsável pela lesão tecidual, aponta para um estado oxidativo exacerbado como detonante na fase inicial, e agravante nas etapas mais avançadas da doença. A exposição dos ácinos pancreáticos a níveis de estresse oxidativo elevados e mantidos ao longo do tempo envolve o aparecimento de efeitos adversos para a integridade estrutural das células e, por conseguinte, para a integridade glandular. Finalmente, como evento comum às duas teorias, a síntese de mediadores inflamatórios pelas células acinares, mastócitos parenquimáticos e células do endotélio vascular atrairiam mais células do sistema imunológico que contribuiriam à produção de citocinas, ERO e outras moléculas de sinalização. Todo isto conflui na alteração da permeabilidade vascular e na interrupção do fluxo sanguíneo, contribuindo assim para o aparecimento da hemorragia, isquemia, necrose, inflamação e edema. Portanto, a resposta imunitária local, que foi lançada inicialmente para combater a inflamação no pâncreas, é a que finalmente acabará por agravar e disseminar o estado inflamatório exacerbado pelo resto do organismo (Rau et al, 1999. Bragança e al, 2000; Wu, 2000; Zyromski et al, 2003; Zhang et al, 2009).

Conseqüentemente, a participação contrastada do estresse oxidativo e da resposta inflamatória na fisiopatologia da PA, assim como a falta de uma terapia eficaz, resultou nas últimas décadas numa intensiva investigação em relação à aplicação de diversos antioxidantes como tratamento preventivo e / ou terapêutico. É sobejamente conhecido que uma dieta rica em frutas e vegetais fornece ao corpo uma série de compostos anti-oxidantes que ajudam a manter um ótimo estado oxidativo para o seu funcionamento adequado sendo, por conseguinte, benéfico para a saúde em geral. No entanto, apesar destes esforços, não se obteve o sucesso esperado na suplementação com antioxidantes isolados, em comparação com os efeitos significativos obtidos em certas doenças pela ingestão de dietas saudáveis, como a mediterrânea. Daí a necessidade de mais estudos para continuar a avançar no conhecimento atual da influência dos antioxidantes na saúde humana em geral, quer em situações fisiológicas quer patológicas.

Com base no que precede, o **Objetivo Geral** da presente Tese de Doutorado tem sido avaliar o efeito quimiopreventivo de antioxidantes (melatonina e resveratrol) num modelo experimental de pancreatite aguda induzida por ceruleína em rato Wistar.

Este Objetivo Geral foi discriminado nos seguintes **Objetivos Específicos**:

1. Analisar o efeito quimiopreventivo da administração exógena de melatonina sobre os fenómenos sistémicos de desintegração glandular, ativação e liberação prematura de enzimas pancreáticas (amilase e lipase), estado oxidativo (corticosterona e capacidade antioxidante total) e resposta inflamatória (IL-1 β , TNF- α e IL-4), durante o processo de indução de pancreatite aguda com ceruleína.
2. Estudar a influência da suplementação preventiva com melatonina sobre a lesão oxidativa tecidual (peroxidação lipídica e oxidação protéica), quantificando assim mesmo os níveis de defesas antioxidantes endógenas no pâncreas (glutathione peroxidase e capacidade antioxidante total) durante o processo de indução de pancreatite aguda com ceruleína.
3. Determinar os efeitos quimiopreventivos da suplementação de resveratrol sobre os fenómenos sistémicos e locais como a desintegração glandular, ativação e liberação prematura de enzimas pancreáticas (amilase e lipase), estado oxidativo ao nível sérico (corticosterona e capacidade antioxidante total) e tecidual (peroxidação lipídica), resposta inflamatória (IL-1 β e IL-10), defesas antioxidantes pancreáticas (glutathione peroxidase e superóxido dismutase) e sinais de cálcio intracelular no processo de indução da pancreatite aguda com ceruleína.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Reactivos

- Acetonitrilo (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Ácido acético glacial (Panreac Química, Barcelona, España).
- Ácido clorhídrico (HCl) (Panreac Química, Barcelona, España).
- Ácido etilenglicol-bis-(2-Aminoetil)-Tetraacético (EGTA) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Ácido morfolinoetanosulfónico (MES) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Ácido pícrico (Panreac Química, Barcelona, España).
- Ácido plurónico (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Ceruleína (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Cloruro cálcico (CaCl_2) (Panreac Química, Barcelona, España).
- Cloruro magnésico (MgCl_2) (Panreac Química, Barcelona, España).
- Cloruro potásico (KCl) (Panreac Química, Barcelona, España).
- Cloruro sódico (NaCl) (Panreac Química, Barcelona, España).
- Colagenasa purificada (CLSPA, 10 ku) (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EE.UU.)
- Ditioneitol (DTT) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Etilendiaminotetracético (EDTA) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Etanol 96° (Guinama, Valencia, España).
- Formaldehído (Panreac Química, Barcelona, España).

- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) (Panreac Química, Barcelona, España).
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4) (Panreac Química, Barcelona, España).
- Fumarato (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Fura 2-acetilmetiléster (Fura-2AM) (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.).
- Glucosa (Panreac Química, Barcelona, España).
- Glutamato (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Glutamina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Hidróxido de sodio (NaOH) (Panreac Química, Barcelona, España).
- Inhibidor de tripsina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Ketamina (Imalgene 500[®]Merial, Barcelona, España).
- Manitol (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Medio basal Eagle (BME) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Melatonina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Metanol (Panreac Química, Barcelona, España).
- Piruvato (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Reactivo de Bradford para ensayo de proteínas (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).
- Resveratrol (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Sacarosa (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Tritón X-100 (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Trizma[®]-Ác. clorhídrico (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Vitaminas esenciales (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).

3.1.2. Aparatos

- Agitador/calentador magnético (Boeco mod. MSH-420).
- Arcón congelador (P-SELECTA mod. 551).
- Balanza de precisión (Blauscal mod. AC-2000).
- Baño de precisión con agitación y regulación electrónica (P-SELECTA mod. Unitronic-Orbital).
- Cámara celular termostatazada con agitación (Digilab Hitachi).
- Cámara digital (Axiocam HRc).
- Centrífuga (P-SELECTA mod. S-549).
- Centrífuga refrigerada (KUBOTA mod. 5800).
- Espectrofotómetro de fluorescencia (Hitachi Ltd. Mod F2000).
- Picadora de hielo granizado (Scotsman Ice Systems mod. AF80).
- Homogeneizador Ultra-turrax[®] (IKA mod. T10 basic).
- Lector de placas microtiter de 96 pocillos (Anthos 2020).
- Lector Bio-Plex (Bio-Rad).
- Microcentrífuga (VWR International mod. Galaxy 14D).
- Microtomo rotario (Microm).
- Mini-agitador (Boeco mod. PSU-2T).
- Ordenador Intel Inside Pentium IV.
- Refrigerador (CORBERÓ mod. 548).
- Sistema de purificación de agua (Millipore mod. Elix 3).
- Sonicador (Sonics & Material mod. VC 50T).
- Termostato de inmersión analógico (P-SELECTA mod. TectronBio)
- Vortex personal (Boeco mod. V-1 plus).

3.1.3. Material Biológico

Para la realización del estudio se utilizaron ratas cepa Wistar de ambos sexos (machos=54 y hembras=127), de edades comprendidas entre las 6-8 semanas y pesos entre 150-300 gramos, criadas y mantenidas durante la realización de los experimentos en las dependencias del Servicio de Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura. Las ratas fueron estabuladas en jaulas individuales, bajo condiciones estándar de luz (fotoperíodo luz-oscuridad 12:12 horas) y temperatura ambiente y acceso *ad libitum* a comida (pellet comercial) y bebida.

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados conforme a los protocolos previamente evaluados y aprobados por el Comité de Bioética de Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura, en base a la legislación vigente sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013, BOE nº 34 del 8 de Febrero de 2013).

3.1.4. Soluciones

✓ **Ceruleína para administración subcutánea**

La ceruleína es un análogo de la colecistoquinina (CCK) extraído de la rana arborícola australiana *Litoria caerulea* (Mayerle y cols., 2013).

Para la preparación de la solución inyectable de ceruleína, se diluyó 1 mg de la misma en 100 ml de solución salina 0,9% (concentración final: 10 µg/ml). Dicha solución final fue alicuotada en volúmenes de 25 ml y almacenada a -20°C hasta el momento de su utilización.

✓ **Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) para administración intraperitoneal**

Para la preparación de la solución inyectable de melatonina, se diluyeron 100 mg del indol en 12,8 ml de solución salina 0,9% (concentración final: 7,8 mg/ml), bajo agitación con calor. La solución final fue almacenada a -20°C hasta el momento de su utilización.

✓ **Resveratrol (trans-resveratrol) para administración intraperitoneal**

Para la preparación de la solución inyectable de resveratrol, se diluyeron en primer lugar 500 mg de la fitoalexina en 10 ml de etanol 70% (concentración final: 50 mg/ml); posteriormente, fueron diluidos 2 ml de esta solución stock en 18 ml de suero salino 0,9%, con el fin de minimizar la interferencia del etanol en la biodisponibilidad del resveratrol. Esta solución final (5 mg/ml) fue almacenada a -20°C hasta el momento de su utilización.

✓ **Solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7**

La solución salina fisiológica utilizada se preparó en base a la siguiente composición:

NaCl	120mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	3,23 mM
Na ₂ HPO ₄	11 mM

Una vez disueltos los componentes en agua destilada, se procedió al ajuste del pH a un valor de 7 y 7,4 con NaOH 1M, y a su almacenamiento a 2°C.

✓ **Solución salina 0.9%**

Para la preparación de la solución salina 0,9%, se diluyeron 900 mg de NaCl en 100 ml de agua destilada. Dicha solución era almacenada a 2°C hasta el momento de su utilización.

✓ **Solución Na-HEPES (pH 7,4)**

La solución Na-HEPES en la que se resuspendieron las células acinares pancreáticas para la determinación de la concentración de calcio intracelular, se preparó en base a la siguiente composición:

HEPES	10 mM
NaCl	140 mM
KCl	4,7 mM
CaCl ₂	1,2 mM
MgCl ₂	1,1 mM
Glucosa	10 mM

En el momento de su utilización, los volúmenes correspondientes de glucosa y CaCl₂ eran añadidos al resto de componentes ya en solución y el pH era ajustado a un valor de 7,4 con NaOH 1M.

✓ **Solución fijadora de Bouin**

La solución fijadora de Bouin, utilizada en la fijación de las muestras pancreáticas para su posterior análisis histopatológico, se preparó en base a la siguiente composición por litro:

Ácido pícrico acuoso saturado (~1,22%)	75 ml
Formaldehído (37-38%)	25 ml
Ácido acético glacial	5 ml

Una vez preparada, se depositó en una botella opaca para evitar la fotooxidación, y se almacenó a 2-8°C hasta el momento de su utilización.

✓ **Tampones para la homogeneización tisular**

▪ **PBS (pH 7,4)**

La solución PBS (pH 7,4) para la homogeneización del tejido pancreático destinada a la determinación de peroxidación lipídica, se preparó en base a la receta anteriormente descrita y se ajustó el pH a un valor de 7,4 con NaOH 1M, almacenándose la solución final resultante a 2-8°C.

En el momento de su utilización, se añadía al homogeneizado tisular BHT a una concentración final de 0,5 M (es decir, 10 µl/ml).

▪ **MES-EDTA**

El tampón MES-EDTA para la homogeneización del tejido pancreático destinada a la determinación de oxidación proteica se preparó en base a la siguiente composición:

MES	50 mM
EDTA	1 mM

Una vez disuelto MES en agua destilada, se procedió al ajuste del pH a un valor de 6,7 con NaOH 1M. Posteriormente, se adicionó EDTA en la concentración deseada y se almacenó la solución final resultante a 2-8°C.

▪ **Tris-Cl/EDTA**

El tampón Tris-Cl/EDTA para la homogeneización del tejido pancreático destinada a la determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPx) se preparó en base a la siguiente composición:

Tris-HCl	50 mM
EDTA	5 mM

Una vez disuelto Tris-HCl en agua destilada, se procedió al ajuste del pH a un valor de 7,5 con NaOH 1M. Posteriormente, se adicionó EDTA en la concentración deseada y se almacenó la solución final resultante a 2°C.

En el momento de su utilización, se añadía al homogeneizado tisular DTT a una concentración final de 1 mM (es decir, 1 µl/ml).

▪ HEPES/EGTA/Manitol/Sacarosa

El tampón HEPES/EGTA/Manitol/Sacarosa para la homogeneización del tejido pancreático destinado a la determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) se preparó en base a la siguiente composición:

HEPES	20 mM (pH 7,2)
EGTA	1 mM
Manitol	201 mM
Sacarosa	70 mM

✓ Tampones para la obtención de células acinares

▪ MJJ

La solución MJJ para la obtención de células acinares se preparó en base a la siguiente composición:

NaCl	120 mM
KCl	72 mM
Piruvato	6mM
Fumarato	7,1 mM
Glutamato	6mM
Glucosa	14mM
Inhibidor de tripsina	0,01%
BME	50 ml

▪ Solución de mezcla

La solución de mezcla para la obtención de células acinares se preparó en base a la siguiente composición por litro:

MJJ	100 ml
HEPES (154 mM)	19,34 ml
KH ₂ PO ₄ (217 mM)	1,2 ml
MgCl ₂ (120 mM)	1,2 ml
Vitaminas esenciales	1,2 ml
Glutamina (3%)	1,2 ml

▪ **Solución de lavado**

La solución de lavado para la obtención de células acinares se preparó en base a la siguiente composición por litro:

Solución de mezcla	100 ml
CaCl ₂	100 mM
BSA	0,2 %

▪ **Solución colagenasa**

La solución colagenasa para la obtención de células acinares se preparó añadiendo 150 µl de colagenasa purificada a 20 ml de solución de lavado previamente preparada.

▪ **Solución de parada**

La solución de parada para la obtención de células acinares se preparó en base a la siguiente composición por litro:

Solución de mezcla	50 ml
CaCl ₂	100 mM
BSA	4%

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Diseño experimental

El diseño del modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína se basó en el procedimiento previamente descrito por San Román y cols. (1990). La ceruleína es un análogo de la CCK extraído de la rana arborícola australiana *Litoria caerulea* (Mayerle y cols., 2013).

- **Inducción de pancreatitis aguda por ceruleína**

Para el establecimiento del modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína, las ratas fueron sometidas a ayuno durante las 18 horas anteriores al comienzo del experimento. La ceruleína fue administrada subcutáneamente (dosis de 20 µg/kg, en un volumen no superior a 0,5 ml) en intervalos de dos horas, hasta llegar a un total de cuatro inyecciones.

Transcurridas 12 horas desde la última inyección de ceruleína, las ratas fueron sacrificadas por decapitación para la obtención de las muestras objeto de estudio.

- **Aplicación quimiopreventiva de melatonina**

Con el objeto de estudiar el efecto quimiopreventivo de la melatonina en la pancreatitis aguda inducida por ceruleína, las ratas fueron divididas en tres grupos experimentales: grupo control (C), grupo pancreatitis (P) y grupo pancreatitis pre-tratado con melatonina (P+preM).

Para la inducción de la pancreatitis aguda se siguió el procedimiento detallado anteriormente. El grupo control (C) recibió inyecciones de solución salina (0,5 ml), de modo que las ratas fueran sometidas al mismo estrés que el resto de grupos, minimizando así la alteración de los resultados finales como consecuencia del proceso de inducción. El grupo pancreatitis (P) fue subdividido en 4 subgrupos, recibiendo cada subgrupo entre una (1x), dos (2x), tres (3x) y cuatro (4x) inyecciones de ceruleína respectivamente, con el fin de comprobar el efecto dosis-dependiente de ceruleína en el desarrollo de la enfermedad. El grupo pancreatitis pre-tratado con melatonina (P+preM) fue subdividido del mismo modo, recibiendo según el subgrupo hasta cuatro dosis del indol (25 mg/kg, en un volumen no superior a 1 ml), administradas intraperitonealmente, 30 minutos antes de cada inyección de ceruleína. Transcurridas 12 horas

desde la última inyección de ceruleína, las ratas fueron sacrificadas por decapitación para la obtención de muestras biológicas objeto de estudio.

- **Aplicación quimiopreventiva de resveratrol**

Con el objeto de estudiar el efecto quimiopreventivo del resveratrol en la pancreatitis aguda inducida por ceruleína, las ratas fueron divididas en tres grupos experimentales: grupo control (C), grupo pancreatitis (P) y grupo pancreatitis pre-tratado con resveratrol (P+preR).

Para la inducción de la pancreatitis aguda se siguió el procedimiento descrito anteriormente. De nuevo, el grupo control (C) recibió inyecciones subcutáneas de solución salina (0,5 ml). El grupo pancreatitis (P) recibió un total de cuatro inyecciones subcutáneas de ceruleína. Al grupo pancreatitis pre-tratado con resveratrol (P+preR) se le administraron intraperitonealmente hasta un total de cuatro dosis de la fitoalexina (10 mg/kg, en un volumen no superior 0,5 ml), en los 30 minutos previos a cada inyección de ceruleína. Transcurridas 12 horas desde la última inyección de ceruleína, las ratas fueron por decapitación sacrificadas para la obtención de muestras biológicas objeto de estudio.

3.2.2. Obtención de muestras biológicas

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, previa sedación con ketamina (150 mg/kg), para la obtención de las siguientes muestras biológicas:

- **Sangre:** obtenida por desanguiación total de los animales y recogida en tubos para serología, sin anticoagulante, que permiten la obtención del suero por la presencia de un gel separador en el fondo de los mismos.
- **Suero:** resultante de la centrifugación (600g, 30 minutos, 20°C) de la sangre recolectada en tubos específicos, descritos anteriormente. El suero así separado fue alicuotado en tubos Eppendorf y almacenado a -20°C, para la realización de posteriores determinaciones bioquímicas.
- **Páncreas:** una vez extraídos, con la ayuda de un bisturí se obtenían pequeñas muestras de cada páncreas, que eran sumergidas en líquido de Bouin-Hollander para la fijación y posterior procesamiento de las muestras de los estudios histopatológicos.

Una vez clasificados y almacenados en bolsas individuales, el resto del páncreas era inmediatamente ultracongelado mediante su inmersión en nitrógeno líquido, para su adecuado almacenamiento y conservación a -80°C, hasta el momento de su procesamiento.

✓ **Homogeneizados pancreáticos:** Previo a la determinación de los distintos parámetros de interés, los páncreas fueron descongelados y homogeneizados. Para ello se pesaron, por cada análisis a realizar, 0,1 gr de tejido pancreático, que fueron transferidos a tubos de polipropileno (en hielo) con 1 ml del tampón correspondiente, compuestos según la siguiente tabla:

Parámetro	Tampón
Lipoperoxidación (LPO)	PBS 20 mM (pH 7,4) BHT 0,5M (10 µl/ml de tampón)
Actividad Superóxido dismutasa (SOD)	HEPES 20 mM (pH 7,2) EGTA 1 mM Manitol 201 mM Sacarosa 70 mM
Actividad Glutación peroxidasa (GPx)	Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) EDTA 5 mM DTT 1 mM (1µl/ml de tampón)
Oxidación proteica	MES 50 mM (pH 6,7) EDTA 1 mM

A continuación, los fragmentos pancreáticos fueron procesados en un homogeneizador durante unos segundos a 20 W, hasta conseguir la homogenización del tejido. Tras dejar reposar los homogeneizados en hielo durante 10-15 minutos, se procedió a su sonicado mediante un pulso de 4-5 segundos, de forma que se facilitaba la disgregación y rotura de las células que conforman el tejido pancreático. Para cada ensayo enzimático, fue necesario centrifugar los correspondientes homogeneizados a las condiciones detalladas en los respectivos protocolos, resumidas a continuación:

Parámetro	Condiciones centrifugación
LPO	3000g, 10 min, 4°C
SOD	1500g, 5 min, 4°C
GPx	10000g, 15 min, 4°C
Oxidación proteica	10000g, 15 min, 4°C

Finalmente, se obtuvieron sobrenadantes listos para su almacenamiento (-80 °C) y posterior determinación de las actividades enzimáticas de interés.

✓ **Células acinares:** la suspensión de células acinares aisladas se obtuvo mediante digestión enzimática del tejido pancreático, según el método de Granados y cols. (2004). Una vez extraídos los páncreas, se disponían en placas de Petri con PBS y se limpiaban de posibles restos de grasa y grandes vasos sanguíneos. Tras la inyección de solución colagenasa (200 U/ml) (véase apartado 3.1.2. Soluciones), el páncreas se incubó durante 5-10 minutos en agitación suave, a 37°C, repitiéndose este paso hasta un total de tres veces. A la digestión enzimática del tejido le seguía un suave pipeteo de la suspensión celular a través de puntas de pipeta con diámetro decreciente, que permitía disociar mecánicamente las células acinares. La suspensión así obtenida, fue transferida a un tubo con solución de parada (véase apartado 3.1.2. Soluciones) para detener la digestión enzimática debida a la colagenasa. Finalmente, y para una limpieza más profunda, se volvía a centrifugar la suspensión durante 2 minutos, a una velocidad de 1800-2000 rpm y temperatura de 4°C, desechándose el sobrenadante y resuspendiéndose el pellet resultante en Na-HEPES.

3.2.3. Determinación de la concentración de corticosterona

La corticosterona es sintetizada por la corteza adrenal e influye en numerosas funciones vitales. Desde hace años, se considera un indicador de estrés fisiológico. De ahí la importancia de su determinación en patologías como la pancreatitis aguda, donde se sospecha que el estrés oxidativo juega un papel determinante en el establecimiento y/o desarrollo de la enfermedad.

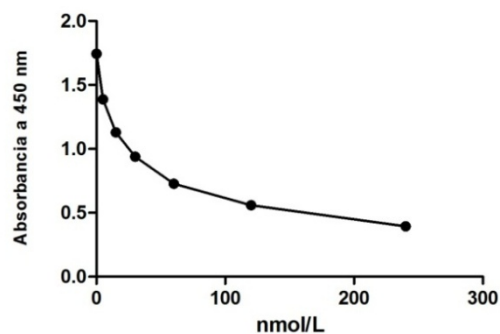
Para la determinación de los niveles séricos de corticosterona se empleó un kit comercial (DRG), mediante el que se ensayaron los sueros procedentes de las ratas experimentales por ELISA competitivo. En él, la cantidad desconocida de corticosterona presente en las muestras problema y una cantidad definida de la misma, conjugada a peroxidasa de rábano, compiten por la interacción con los sitios de unión de los anticuerpos frente a corticosterona (anti-corticosterona) adheridos a los pocillos de la placa de titulación. Tras sucesivos lavados de la placa, que eliminan el exceso de moléculas conjugadas no unidas, la adición de una solución substrato producirá un cambio de color en el medio que nos permitirá determinar la concentración de corticosterona, dado que se considera inversamente proporcional a la densidad óptica registrada para cada muestra.

Para la ejecución del ELISA competitivo, el kit se componía de los siguientes reactivos:

Componente	Cantidad	Envases	Especificaciones
Placa de titulación de 96 pocillos (revestidos de anti-corticoesterona policlonal)	-	1 placa (12 × 8 pocillos)	Listo para usar
Estándares 0-6	1 ml	7 viales	Listo para usar
Conjugado enzimático (250X)	150 µl	1 vial	Diluir 1:250 en diluyente del conjugado enzimático
Diluyente del conjugado enzimático	25 ml	1 vial	Listo para usar
Solución substrato	25 ml	1 vial	Listo para usar
Solución de parada	14 ml	1 vial	Listo para usar
Solución de lavado (14X)	30 ml	1 vial	Diluir 1:40 en agua destilada

Una vez incubados (1 hora a temperatura ambiente) los estándares y sueros problema con la enzima conjugada, se lavó la placa hasta 3 veces con solución de lavado. Una segunda incubación, tras la adición del substrato (15 minutos a temperatura ambiente) provoca un cambio de color en el medio debido a la acción de la peroxidasa conjugada. La reacción se interrumpió mediante la adición de solución de parada y, posteriormente, se realizó la lectura de la absorbancia a 450 nm de longitud de onda.

Las absorbancias registradas por duplicado para cada estándar y muestra fueron procesadas para la obtención de los valores promedios. Este cálculo permite construir una curva patrón, expresando los promedios de los estándares frente a su concentración, como se muestra en la siguiente gráfica:



Para la obtención de las correspondientes concentraciones de corticosterona (nmol/L) en los sueros de las ratas experimentales, se aplicó a los valores promedio el modelo de regresión no lineal llamado *FourParameterLogistic (4PL)*, calculado automáticamente por el software estadístico *GraphPadPrism*. Este modelo estadístico se basa en la siguiente ecuación:

$$F(x) = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D$$

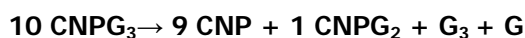
En donde:

- A= mínimo de la asíntota (en la determinación por ELISA, correspondería al valor de la absorbancia a una concentración 0 del estándar).
- B= pendiente de la curva
- C= punto de inflexión
- D= máximo de la asíntota (en la determinación por ELISA, correspondería con el valor de la absorbancia a una concentración infinita del estándar).

3.2.4. Determinación de la concentración de amilasa

La α -amilasa se encarga de la digestión enzimática del glucógeno y el almidón, produciéndose principalmente en glándulas salivales y páncreas exocrino. De ahí, que la determinación de sus niveles se utilice para diagnosticar o controlar enfermedades pancreáticas, como la pancreatitis aguda.

La determinación sérica de la actividad α -amilasa se llevó a cabo mediante la utilización de un kit comercial (Panreac), basado en la hidrólisis del 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriósido (CNP_{G3}) a 2-cloro-4-nitrofenol (CNP), 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltósido (CNP_{G2}), maltotriosa (G₃) y glucosa (G), según la siguiente reacción:



Se considera que la velocidad de formación de CNP determinada fotométricamente es proporcional a la concentración catalítica de α -amilasa en las muestras problema. Por tanto, el reactivo suministrado tenía la siguiente composición:

Reactivo	Composición	Especificaciones
R	MES pH 6,0 (100 mmol/L) CNP _{G3} (2,25 mmol/L) Cloruro sódico (350 mmol/L) Acetato sódico (6 mmol/L) Tiocianato potásico (900 mmol/L) Ácida sódica (0,95 g/L)	Listo para usar

Las muestras de suero procedentes de las ratas experimentales (véase apartado 3.2.2. Obtención de muestras biológicas) fueron diluidas en solución salina 0,9% (1:3) y ensayadas por duplicado en placas de microtitulación de 96 pocillos, donde se mezclaron con el reactivo R. Del mismo modo, fueron ensayados un control positivo (patológico) y otro negativo (normal). Tras la incubación de la placa completa a 37°C durante 30 segundos, se procedió a la lectura de la absorbancia inicial de la muestra, así como a tres lecturas más separadas entre sí por un minuto, a una longitud de onda de 405 nm. Éstas servirían para calcular el promedio del incremento de la absorbancia con respecto al tiempo ($\Delta A/\text{min}$) de cada muestra y, finalmente, la actividad amilasa de las mismas aplicándose la siguiente ecuación:

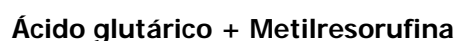
$$\text{U/L de Amilasa} = \Delta A/\text{min} \times 3954$$

Los resultados de la actividad α -amilasa fueron expresados en términos de unidades/litro (U/L), que se define como la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de substrato por minuto, en condiciones estándar.

3.2.5. Determinación de la concentración de lipasa

La lipasa pancreática es esencial para la absorción y digestión de nutrientes; en concreto, cataliza la hidrólisis de los ésteres de glicerol de los ácidos grasos. Se considera un marcador útil para el diagnóstico de enfermedades pancreáticas como la pancreatitis aguda.

El kit comercial (Panreac) empleado para la determinación de la lipasa en suero, se basa en la capacidad de la enzima para hidrolizar el sustrato 1-2-O-dilauril-rac-glicerol-3 glutárico-(6'-metilresorufina)-éster, en presencia de colipasa, iones calcio y desoxicolato, según la siguiente reacción:



Se considera que la velocidad de formación de metilresorufina determinada fotométricamente es proporcional a la concentración catalítica de lipasa en las muestras problema. De este modo, los reactivos suministrados en el kit fueron los siguientes:

Reactivo	Composición	Especificaciones
Tampón R1	TRIS pH 8,3 (40 mmol/L) Colipasa (≥ 1 mg/L) Desoxicolato (1,8 mmol/L) Taurodesoxicolato (7,2 mmol/L)	Listo para usar
Sustrato R2	Tartrato pH 4,0 (15 mmol/L) Sustrato de Lipasa ($\geq 0,7$ mmol/L) Cloruro cálcico (0,1 mmol/L)	Listo para usar
Calibrador Lipasa (patrón)	Suero humano liofilizado (actividad lipasa indicada en la etiqueta)	Reconstituir en 1 ml de agua destilada

Las muestras de suero procedentes de las ratas experimentales (véase apartado 3.2.2. Obtención de muestras biológicas) fueron diluidas en solución salina 0,9% (1:10) y ensayadas por duplicado en placas de microtitulación de 96 pocillos, donde se mezclaron con ambos reactivos. Asimismo, se establecieron duplicados para la obtención de valores de absorbancia para un blanco y un patrón, que serían usados posteriormente en el cálculo de la actividad lipasa, y para los controles positivo (patológico) y negativo (normal). Tras la incubación de la placa completa a 37°C durante un minuto, se procedió a la lectura de la absorbancia inicial de la muestra, así como a dos lecturas más separadas entre sí por un minuto, a una longitud de onda de 580 nm. Éstas servirían para calcular el promedio del incremento de la absorbancia con respecto al tiempo ($\Delta A/\text{min}$). Después de calcular los promedios netos obtenidos para el patrón y para cada muestra, restando para ello el valor promedio del blanco, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{U/L de lipasa} = \left(\frac{(\Delta A/\text{min})_{\text{muestra}}}{(\Delta A/\text{min})_{\text{patrón}}} \right) \times \text{Actividad Calibrador}$$

Los resultados de la actividad lipasa de cada muestra fueron expresados en términos de unidades/litro (U/L), que se define como la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar.

3.2.6. Determinación de la actividad antioxidante total

Los seres vivos han desarrollado un sistema de defensa antioxidante capaz de contrarrestar los efectos negativos causados por radicales libres de oxígeno o nitrógeno. Este sistema no sólo lo forman enzimas antioxidantes como SOD, GPx y catalasa (CAT) sino también macromoléculas como albúmina, ceruloplasmina y ferritina, y otras moléculas de pequeño

tamaño como ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, glutatión reducido, ácido úrico y bilirrubina. De este modo, el conjunto de antioxidantes endógenos, así como aquellos derivados de los alimentos, representarían la actividad antioxidante total del sistema, que podría proveer una información biológica más relevante que la de los componentes por separado. La capacidad antioxidante total fue determinada tanto en suero como en tejido pancreático.

En suero: El kit comercial empleado (Cayman) para la determinación de la capacidad antioxidante total del suero de las ratas experimentales, se basa en la habilidad de los antioxidantes presentes en la muestra de inhibir la oxidación del ABTS[®] (2,2'-Azino-di-[3-etilbenziazolin sulfonato]) a ABTS^{®•+} por la metmioglobina. Así, la cantidad de ABTS^{®•+} producida puede ser monitorizada mediante la lectura de la absorbancia a 750 nm o 405 nm. Es decir, los antioxidantes presentes en la muestra problema causarán una supresión de la absorbancia, a cualquiera de estas dos longitudes de onda, que será directamente proporcional a su concentración. Dicha capacidad antioxidante del sistema es comparada con la de un análogo del tocoferol soluble en agua, el llamado Trolox y, por tanto, cuantificada en milimolar de equivalentes Trolox.

Los componentes suministrados en el kit fueron los siguientes:

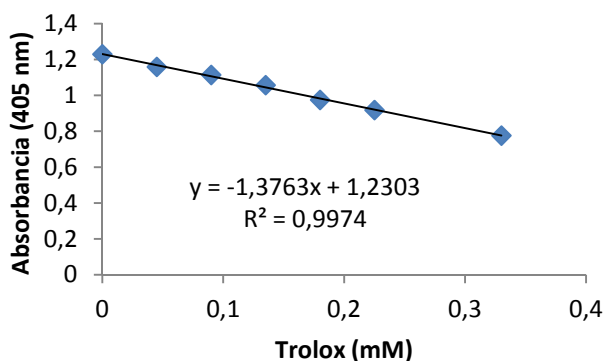
Componente	Envases	Especificaciones
Tampón del ensayo antioxidante (10X)	1 vial	Diluir 1:10 en agua de grado HPLC
Cromógeno del ensayo antioxidante	3 viales	Reconstituir en 6 ml de agua de grado HPLC
Metmioglobina del ensayo antioxidante	2 viales	Reconstituir en 600 μ l de tampón de ensayo (previamente diluido)
Trolox del ensayo antioxidante	3 viales	Reconstituir en 1 ml de agua de grado HPLC
H₂O₂ del ensayo antioxidante	1 vial	Diluir 1:100 y, posteriormente 1:200, en agua de grado HPLC
Placa de titulación de 96 pocillos (ensayo colorimétrico)	1 placa (12 \times 8 pocillos)	Listo para usar
Cobertor plástico para placa de titulación de 96 pocillos	1 cobertor plástico	Listo para usar

Una vez reconstituido el Trolox, se procedió a la preparación de los estándares en tubos de vidrio según la siguiente tabla:

Estándar	Trolox reconstituido (μl)	Tampón de ensayo (μl)	Concentración final (mMTrolox)
A	0	1.000	0
B	30	970	0,045
C	60	940	0,090
D	90	910	0,135
E	120	880	0,180
F	150	850	0,225
G	220	780	0,330

Los sueros procedentes de las ratas experimentales fueron obtenidos como se señala en el apartado 3.2.2. (Obtención de muestras biológicas) y diluidos 1:30 en tampón de ensayo previamente diluido, para ser ensayados por duplicado. En cada pocillo se dispuso metmioglobina y cromógeno, así como estándares y muestras, según correspondiera. La reacción se inició mediante la adición de H₂O₂. Tras cubrir la placa de titulación con el cobertor plástico e incubarla en un agitador durante 5 minutos a temperatura ambiente, se procedió a realizar la lectura de absorbancia a 405 nm.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se calcularon los promedios de cada muestra y estándar; éstos últimos serían representados gráficamente frente a sus correspondientes concentraciones finales, resultando la siguiente curva patrón:



El cálculo de la concentración antioxidante presente en las muestras problema, se realizó aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Antioxidante (mM)} = \left[\frac{\text{Absorbancia media de la muestra} - \text{corte eje Y}}{\text{Pendiente}} \right] \times \text{dilución}$$

En tejido pancreático: Para la determinación de la capacidad antioxidante total en tejido pancreático se empleó un kit comercial (Oxford Biomedical Research) con los siguientes componentes:

Componente	Cantidad	Especificaciones
Tampón de dilución	60 ml	-
Solución de cobre	5 ml	-
Solución de parada	50 µl	-
Estándar Trolox	-	Reconstituir en 2 ml de etanol

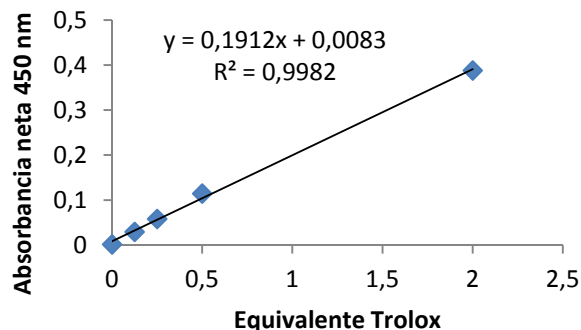
El ensayo se basa en el aprovechamiento del potencial reductor de la muestra para la conversión del ion Cu^{2+} a Cu^{1+} . Dicha forma reducida del cobre dará lugar a un complejo estable (2:1) con el reactivo cromogénico, cuya absorción máxima se produce a una longitud de onda de 450 nm.

Una vez reconstituido el estándar Trolox inicial (2 mM), se procedió a la preparación del resto de estándares según la siguiente tabla:

Estándar	Volumen de agua destilada (µl)	Volumen transferido (µl)	Fuente de Transferencia	Concentración final (mMTrolox)
S ₅	-	2000	2 mM	2,0
S ₄	500	500	S ₅	1,0
S ₃	500	500	S ₄	0,5
S ₂	500	500	S ₃	0,25
S ₁	500	500	S ₂	0,125
S ₀	500	-	-	0

Para el ensayo por duplicado de los homogeneizados pancreáticos (véase el apartado 3.2.2. Obtención de muestras biológicas), se hizo una dilución previa 1:40 en tampón de dilución, tanto de las muestras como de los estándares, dispensándose en los correspondientes pocillos de una placa de titulación. A continuación, se estableció un blanco con tampón de dilución. De este modo, se realizó una primera lectura del conjunto a 450 nm. Tras añadir la solución de cobre a cada pocillo e incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente, se finalizó la reacción con solución de parada y se realizó la segunda lectura a la misma longitud de onda.

Una vez obtenidas las dos lecturas, y mediante los valores promedios, se calculó la absorbancia neta de cada estándar y muestra, restando los valores de la primera lectura a los de la segunda. Así, se representaron las absorbancias netas de los estándares frente a la concentración del Trolox, para la obtención de la siguiente curva patrón:



Para el cálculo de la capacidad antioxidante total de las muestras, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Equivalentes Trolox (mM)} = \left(\frac{\text{Absorbancia muestras} - \text{corte eje Y}}{\text{pendiente}} \right) \times \text{dilución}$$

Finalmente, los valores de actividad antioxidante total de los homogeneizados pancreáticos fueron corregidos por la concentración de proteínas totales del tejido, siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.2.7. Determinación de la concentración de citocinas

Las citocinas son mediadores de la inflamación y, en muchos casos, indicadores de la progresión de una enfermedad. En una patología de carácter inflamatorio como la pancreatitis aguda, la exacerbación de la producción de éstas por parte de células inmunitarias e, incluso, de las propias células acinares, puede suponer un desenlace fatal para el paciente. De ahí la importancia en el conocimiento sobre el despliegue de la respuesta inflamatoria de cara a un futuro control terapéutico.

El kit comercial utilizado (Bio-Rad) para la determinación de la actividad sérica se basa en un principio similar al de ELISA-sándwich, donde anticuerpos específicos unidos covalentemente a bolas magnéticas reaccionan con el conjunto de biomarcadores de interés (como TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-10) al incubarse con la muestra. Después de una serie de lavados para eliminar las moléculas no unidas, se crean los llamados complejos sándwich, a través de la adición de anticuerpos biotinilados. Finalmente, dichos complejos se ponen de

manifiesto a través de la adición del conjugado estreptavidina-ficoeritrina, funcionando este último compuesto como un indicador fluorescente o *reporter*.

Para la realización del ensayo por duplicado de los sueros extraídos a las ratas experimentales (véase apartado 3.2.2. Obtención de muestras biológicas), se suministraron los siguientes componentes:

Componente	Cantidad	Especificaciones
Diluyente de estándar	10 ml	Listo para usar
Diluyente de muestra	40 ml	Listo para usar
Tampón de ensayo	50 ml	Listo para usar
Tampón de lavado	200 ml	Listo para usar
Diluyente de los anticuerpos de detección	5 ml	Listo para usar
Estreptavidina-ficoeritrina (100x)	1 tubo	Diluir 1:100 en tampón de ensayo
Estándar	1 vial	Reconstituir en 500 µl de diluyente estándar
Bolas magnéticas acopladas (20x)	1 tubo	Diluir 1:20 en tampón de ensayo
Anticuerpos de detección (20x)	1 tubo	Diluir 1:20 en diluyente de anticuerpos de detección
Placa de titulación de 96 pocillos (ensayo colorimétrico)	1 placa (12 × 8 pocillos)	Listo para usar
Cobertor plástico para placa de titulación de 96 pocillos	1 cobertor plástico	Listo para usar

En primer lugar, se diluyeron las muestras (1:4) en diluyente de muestras y se preparó una batería de ocho estándares, diluidos cada uno de ellos 4 veces con respecto al anterior. A continuación, se humedeció la placa de titulación con tampón de ensayo, que fue retirado para añadir las bolas magnéticas acopladas. Tras un doble lavado de la placa con tampón de lavado, se adicionaron los blancos, controles, estándares y muestras, según correspondiera. A continuación, siguió la secuencia de lavados, adición de componentes y centrifugaciones (a temperatura ambiente y agitación) detallada a continuación:

- Incubación de 1 hora y triple lavado de la placa.
- Adición del anticuerpo biotinilado.
- Segunda incubación de 30 minutos.
- Adición del complejo estreptavidina-ficoeritrina.
- Incubación de 10 minutos.
- Lavado triple de la placa.

Finalmente, el contenido de los pocillos fue resuspendido en tampón de ensayo y sometido a agitación orbital de 1100 rpm durante 30 segundos.

Los resultados finales se obtuvieron mediante la lectura y el análisis automatizado mediante el sistema Bio-Plex. Este sistema ilumina con láser rojo (635 nm) el fluorocromo de cada bola para así poder identificarlas y clasificarlas y, al mismo tiempo, excita con laser verde (532 nm) la ficoeritrina para generar la llamada señal *reporter*, detectada por un tubo fotomultiplicador. El software integrado en el sistema presenta los datos tanto en forma de intensidad de fluorescencia media (IFM), como de concentración (pg/ml). Se considera que la concentración de analito unido a cada bola magnética es directamente proporcional al IFM de la señal *reporter*.

3.2.8. Determinación del grado de lipoperoxidación

La lipoperoxidación es un fenómeno bien conocido de daño celular mediado por ERO y, por tanto, se considera un buen marcador de estrés oxidativo en células y tejidos. Los peróxidos procedentes de ácidos grasos poliinsaturados son inestables y se descomponen rápidamente para generar malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenoales (HAE), productos que son utilizados en la determinación del grado de peroxidación lipídica.

El kit comercial usado (Oxford Biomedical Research) para la determinación del grado de lipoperoxidación en tejido pancreático, se basa en la detección de MDA a través de la reacción con el reactivo cromogénico N-metil-2-fenilindol a 45°C, para dar lugar a un cromóforo estable con un máximo de absorbancia a 586 nm de longitud de onda. Los componentes suministrados fueron los siguientes:

Componente	Cantidad	Composición	Especificaciones
Reactivo R1 (determinación de MDA)	13 ml	N-metil-2-fenilindol (en acetonitrilo)	Diluir 3:1 en diluyente
Reactivo R2 (determinación de MDA+HAE)	4 ml	Ácido metanosulfónico	-

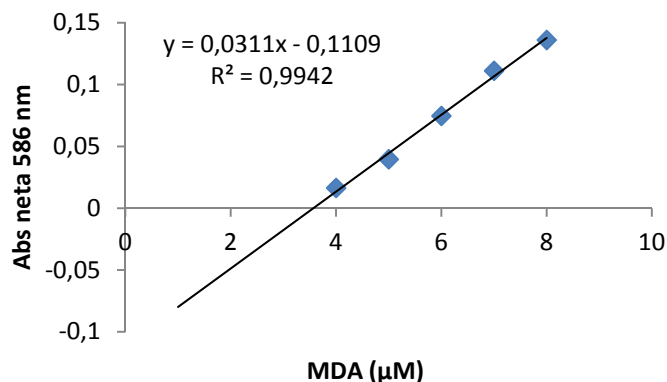
Estándar MDA	200 μ l	1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMOP, en Tris-HCl)	Diluir 1:500 en agua destilada
Diluyente	5,5 ml	Hierro férrico (en metanol)	-
Placa de titulación de 96 pocillos (ensayo colorimétrico)	-	1 placa (12 \times 8 pocillos)	Listo para usar

Antes de comenzar con el ensayo por triplicado de los homogeneizados pancreáticos (tal y como se detalla en el apartado 3.2.2. Obtención de muestras biológicas), se preparó un blanco a base de acetonitrilo (75%) y diluyente (25%), y ácido clorhídrico a una concentración del 37%. En segundo lugar, se procedió a la composición de los estándares, en base a la siguiente tabla:

Estándar	MDA (μl)	Agua destilada (μl)	Concentración MDA (μM)
E ₀	-	200	0
E ₁	5	195	0,5
E ₂	10	190	1,0
E ₃	25	175	2,5
E ₄	50	150	5,0
E ₅	100	100	10,0
E ₆	150	50	15,0
E ₇	200	-	20,0

Los estándares y las muestras fueron incubados a 45 °C y durante 60 minutos en tubos de microcentrífuga junto con reactivo R1 y HCl 37%. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 15000g durante 10 minutos, con el fin de obtener un sobrenadante limpio para cada una. Parte de estos sobrenadantes fueron transferidos a la placa para realizar la lectura de la absorbancia a 586 nm.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se calcularon los valores promedios de estándares y muestras; posteriormente, se obtuvieron las absorbancias netas de los estándares, es decir, la diferencia entre el valor de cada estándar y el valor de absorbancia del blanco, para representarlas gráficamente frente a la concentración de MDA en la siguiente recta patrón:



De este modo, se pudieron obtener las concentraciones de MDA en la muestra, aplicando los promedios netos de cada una en la siguiente ecuación:

$$[\text{MDA}] (\mu\text{M}) = \frac{\text{Abs (586 nm)} - \text{corte eje X}}{\text{pendiente}}$$

Finalmente, los valores de la concentración de MDA obtenida para los homogeneizados pancreáticos fueron corregidos por la concentración de proteínas totales del tejido, siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.2.9. Determinación de la actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD)

Tal y como se comentó anteriormente, las metaloenzimas SOD forman parte del sistema de defensa antioxidante celular, catalizando la dismutación de anión superóxido en oxígeno molecular y H_2O_2 , según la siguiente reacción:



Tres tipos de SODs han sido caracterizadas en función del metal que actúe como cofactor. Así podemos hablar de cobre/zinc (Cu/Zn), manganeso (Mn) y hierro (Fe) SODs, de localización citosólica, mitocondrial y extracelular, respectivamente.

Para la determinación en tejido pancreático de la actividad estos tres tipos de SODs, se empleó un kit comercial (Cayman) basado en el uso de una sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxido generados por las enzimas xantina oxidasa e hipoxantina.

Los páncreas extraídos de las ratas objeto de experimentación fueron descongelados y procesados para la obtención de homogeneizados tisulares (tal y como se describe en el

apartado 3.2.2. Obtención de muestras biológicas), como paso previo a la medición de la actividad SOD. El kit utilizado con este fin disponía de los siguientes componentes:

Componente	Cantidad	Envases	Especificaciones
Tampón de ensayo (10X)	5 ml	1 vial	Diluir 1:10 en agua de grado HPLC
Tampón de muestra (10X)	5 ml	1 vial	Diluir 1:10 en agua de grado HPLC
Detector de radicales	250 µl	1 vial	Diluir 1:400 en tampón de ensayo (previamente diluida)
Estándar SOD	100 µl	1 vial	Diluir 1:100 en tampón de muestra (previamente diluida)
Xantina oxidasa	150 µl	3 viales	Diluir 1:40 en tampón de muestra (previamente diluida)
Placa de titulación de 96 pocillos (ensayo colorimétrico)	-	1 placa (12 × 8 pocillos)	Listo para usar

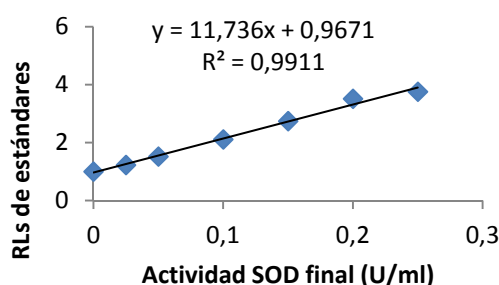
Una vez listos los reactivos, se procedió a la preparación de los estándares, realizando en tubos de ensayo de cristal diversas diluciones del estándar original con tampón de muestra (ambos pretratados, como se especifica anteriormente), en base a la siguiente tabla:

Estándar	SOD original (µl)	Tampón de muestra (µl)	Actividad SOD final (U/ml)
A	0	1.000	0
B	20	980	0,025
C	40	960	0,05
D	80	920	0,1
E	120	880	0,15
F	160	840	0,2
G	200	800	0,25

El ensayo se realizó por duplicado, dispensando en primer lugar a todos los pocillos el detector de radical y, posteriormente, los estándares y muestras, según correspondiera. La reacción se inició por adición de xantina oxidasa. Tras una breve agitación que permitiera la

adecuada mezcla de los componentes, la placa se protegía con el cobertor plástico y se incubaba en un agitador a 20 minutos y temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura de la absorbancia de las muestras a 450 nm de longitud de onda.

Los valores de absorbancia así obtenidos fueron analizados y procesados para el cálculo de la absorbancia media de cada estándar y muestra. A continuación, se obtuvieron los ratios linearizados (RLs), dividiendo el valor medio de la absorbancia del estándar A por sí mismo y, posteriormente, por el de todos los demás estándares y muestras. Dichos RLs fueron representados gráficamente en función de la actividad SOD final (U/ml) de cada estándar, para la obtención de la siguiente recta patrón:



En base a la ecuación de la recta patrón así obtenida, se calculó la actividad SOD de las muestras, aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{SOD (U/ml)} = \frac{\text{RL muestra} - \text{corte eje Y}}{\text{pendiente}} \times \frac{0,23 \text{ ml}}{0,01 \text{ ml}}$$

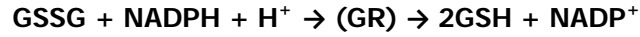
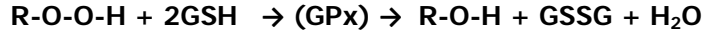
De este modo, se define una unidad de SOD como la cantidad de enzima necesaria para exhibir el 50% de dismutación de radical superóxido.

Finalmente, los valores de actividad SOD de los homogeneizados pancreáticos fueron corregidos por la concentración de proteínas totales del tejido, siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.2.10. Determinación de la actividad enzimática glutatión peroxidasa (GPx)

La enzima GPx cataliza la reducción de hidroperóxidos, como el H_2O_2 . Los centros activos de selenocisteína presentes en cada una de las cuatro subunidades que conforman la enzima, participan directamente en la reducción del sustrato peróxido. Es necesaria la presencia de glutatión reducido, que se comporta como el último donante de electrones que regenera la forma reducida de la selenocisteína.

El kit comercial utilizado (Cayman) mide la actividad GPx en muestras de tejido pancreático de forma indirecta, a través de una reacción acoplada donde participan glutatión reductasa (GR) y glutatión oxidado (GSSG), según el siguiente esquema:



La oxidación de NADPH a NADP⁺ produce una disminución de la absorbancia a 340 nm, que se considera directamente proporcional a la actividad GPx en la muestra.

Los páncreas extraídos de las ratas objeto de experimentación fueron descongelados y procesados para la obtención de homogeneizados tisulares (tal y como se describe en el apartado 3.2.2. Obtención de muestras biológicas), como paso previo a la medición de la actividad GPx. Para la realización del ensayo, se disponía de los siguientes componentes suministrados por la casa comercial:

Componente	Cantidad	Envases	Especificaciones
Tampón de ensayo (10X)	3 ml	1 vial	Diluir 1:10 en agua de grado HPLC
Tampón de muestra (10X)	3 ml	1 vial	Diluir 1:10 en agua de grado HPLC
GPx (control)	50 µl	1 vial	Diluir 1:50 en tampón de muestra
Mezcla co-substrato	-	3 viales	Reconstituir cada vial en 2 ml de agua de grado HPLC
Hidroperóxido de cumeno	2,5 ml	1 vial	Listo para usar
Placa de titulación de 96 pocillos (ensayo colorimétrico)	-	1 placa (12 × 8 pocillos)	Listo para usar
Cobertor plástico para placa de titulación de 96 pocillos	-	1 cobertor plástico	Listo para usar

El ensayo por triplicado de los homogeneizados pancreáticos comenzó dispensando en los pocillos correspondientes tampón de ensayo, mezcla co-substrato, control GPx y muestras.

La reacción se iniciaba añadiendo a todos los pocillos usados hidróperóxido de cumeno. Tras una breve agitación, se procedía a la lectura de la absorbancia a 340 nm cada minuto, obteniendo al menos 5 lecturas.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se trazaron éstos en función del tiempo para así obtener la pendiente de la porción lineal de la curva. Posteriormente, se determinó para el control GPx la tasa $\Delta A_{340}/\text{min}$ y se restó este valor a cada muestra. De este modo, para calcular la actividad GPx, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad GPx (nmol/min/ml)} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min} \times 0,19 \text{ ml}}{0,00373 \mu\text{M}^{-1} \times 0,22 \text{ ml}}$$

Finalmente, los valores de actividad GPx de los homogeneizados pancreáticos fueron corregidos por la concentración de proteínas totales del tejido, siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.2.11. Determinación del grado de oxidación proteica

Uno de los marcadores de oxidación proteica más comúnmente usado es el contenido en carbonilos proteicos. Algunos de los cationes que participan en el ciclo redox, como Fe^{2+} y Cu^{2+} , pueden unirse a sitios específicos de unión presentes en proteínas. Esta unión, junto con sucesivos ataques por parte de H_2O_2 u O_2 , transformaría los grupos amino de la cadena lateral de la proteína (como lisina, arginina, prolina o histidina) en grupos carbonilo. Sin embargo, la oxidación proteica mediada por metales no es el único mecanismo por el que los grupos carbonilo son introducidos en las proteínas.

El kit comercial usado (Cayman) detecta los grupos carbonilos presentes en las proteínas de la muestra de tejido pancreático a través de la reacción con dinitrofenilhidrazina (DNPH), formándose una base de Schiff que dará lugar a la correspondiente hidrazona. De este modo, la cantidad de proteína-hidrazona producida podrá ser analizada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 360-385 nm. Los componentes necesarios para la reacción fueron los recogidos en la siguiente tabla:

Componente	Envases	Especificaciones
Ácido clorhídrico (HCl)	2 viales	Reconstituir cada vial en 40 ml de agua de grado HPLC
DNPH	2 viales	Reconstituir cada vial en 10 ml de HCl (previamente diluido)

Solución TCA	1 vial	Obtener diluciones al 20% y 10% con agua de grado HPLC
Hidrocloreuro de guanidina	1 vial	Listo para usar
Etanol	2 viales	Listo para usar
Acetato de etilo	1 vial	Mezclar en proporción 1:1 con etanol
Placa de titulación de 96 pocillos (ensayo colorimétrico)	1 placa (12 × 8 pocillos)	Listo para usar
Cobertor plástico para placa de titulación de 96 pocillos	1 cobertor plástico	Listo para usar

Antes de comenzar con el ensayo, se prepararon los homogeneizados de las muestras pancreáticas, tal y como se describe en el apartado 3.2.2. Obtención de muestras biológicas. Éstos fueron transferidos por duplicado a dos tubos de plástico e incubados durante una hora y en oscuridad con DNHP el llamado *tubo muestra*, y con HCl el denominado *tubo control*. Transcurrido este tiempo, se realizaron los siguientes ciclos de resuspensión/centrifugación (10.000 g, 10 minutos, 4 °C):

1. Resuspensión de los pellets en TCA al 20%, manteniendo los tubos en hielo durante 5 minutos, antes de la centrifugación.
2. En TCA 10% manteniendo los tubos en hielo durante 5 minutos, antes de la segunda centrifugación.
3. En la mezcla de etanol/acetato de etilo (1:1), antes de la tercera centrifugación. Este paso se repitió hasta dos veces más.
4. En hidrocloreuro de guanidina.

Tras la última centrifugación, las muestras y controles pudieron ser transferidos por duplicado a la placa de titulación, donde se realizó la lectura de la absorbancia a 360-385 nm. Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se calcularon las absorbancias medias y las corregidas (AC), restando los valores medios de los controles a los de las muestras. Para calcular la concentración de carbonilos se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Carbonilos proteicos (nmol/ml)} = [AC / 0,011 \mu\text{M}^{-1}] (500 \mu\text{l}-200 \mu\text{l})$$

Finalmente, los valores de carbonilos proteicos de los homogeneizados pancreáticos fueron corregidos por la concentración de proteínas totales del tejido, siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.2.12. Determinación de la concentración intracelular de calcio

El Fura 2-acetilmetiléster (Fura 2-AM) es una herramienta fundamental para la detección de variaciones intracelulares de la concentración de calcio. Su K_d para el calcio de 150-250 nM permite detectar variaciones muy pequeñas (del orden de nM) del ión. Adicionalmente, presenta dos longitudes de onda de excitación (340 y 380 nm) y una longitud de onda de emisión (505 nm). De esta forma, si excitamos el fluoróforo a 340 nm, cuando el ión calcio se une a la molécula se produce un incremento de fluorescencia emitida a 505 nm; por el contrario, a 380 nm la fluorescencia emitida disminuye. Estas características garantizan que obtengamos una lectura de la concentración de calcio correcta, e impide errores debido al fotoblanqueo de la sonda, o artefactos resultantes de la manipulación de las muestras. Otra cualidad importante de esta sonda es que presenta el punto isobético (o punto de isofluorescencia) a 360 nm, lo cual resulta útil a la hora de monitorizar los cambios en la fluorescencia no dependiente de calcio o para apreciar la pérdida defluorescencia (fenómeno conocido como *quenching*), al unirse la molécula a metales pesados como el Mn^{2+} . Por otro lado, el inconveniente que se presenta al emplear esta sonda es que si nos excedemos tanto en la concentración de Fura 2-AM, como en el tiempo de incubación de las células, puede originarse una compartimentalización no deseada de la sonda en los diferentes orgánulos intracelulares.

Para llevar a cabo la carga con el indicador fluorescente, se incubó la suspensión de células acinares con Fura2-AM (4 μ M) y ácido plurónico (4 μ l/ml de Na-HEPES) durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, tal como se indica en el método de González y cols. (2002). Una vez finalizado el período de incubación, se realizó una centrifugación suave (150 *g*) durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante, que contiene el exceso del fluoróforo que no ha penetrado en las células. A continuación, se resuspendió el precipitado en nuevo medio de Na-HEPES para llevar a cabo la determinación de la concentración de calcio intracelular empleando un espectrofluorímetro. Las muestras fueron analizadas en alícuotas de 2 ml, que eran depositadas en la cubeta de cuarzo y mantenidas en agitación continua y temperatura constante (37°C). De este modo, eran excitadas alternativamente a longitudes de onda de 340 y 380 nm para, posteriormente, recoger la fluorescencia emitida a la longitud de onda de 505 nm. Los cambios en la concentración de calcio intracelular fueron monitorizados y expresados como el ratio de la fluorescencia emitida a 505 nm cuando excitamos las células a 340 nm, dividido por la emitida al excitar a 380 nm (Ratio: 340/380).

En último lugar, una vez hemos registrado los valores de ratio de Fura-2 (340/380) de la fluorescencia obtenida en los experimentos, se calculó la concentración de calcio libre intracelular por el método de Grynkiewicz y cols., (1985), cuya fórmula se describe a continuación:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \beta$$

En donde:

- R_{\min} : Ratio de fluorescencia en medio libre de Ca^{2+} .
- R_{\max} : Ratio de fluorescencia en condiciones de saturación de Ca^{2+}
- β : Cociente entre S_f (intensidad de fluorescencia en ausencia de Ca^{2+} a 380 nm.) y S_b (intensidad de fluorescencia del fura saturado de Ca^{2+} a 380 nm).
- K_d : Constante de disociación del indicador para el Ca^{2+} , que suele variar en función de la temperatura (a 37 °C es de 214 nM para el fura 2-AM).

Por otro lado, para la obtención de estos parámetros se calibró cada experimento, saturando de calcio el medio extracelular por adición a la cubeta de una concentración final de calcio de 1 mM. El S_b y R_{\max} se obtuvieron al romper las células empleando una solución de Tritón X-100 (0,05 %), de modo que todo el Fura 2 existente en el interior de las células se pone en contacto con el calcio. A continuación, se obtuvieron los parámetros S_f y R_{\min} añadiendo a la suspensión una solución con una alta concentración de EGTA (50 mM).

3.2.13. Estudio y valoración de parámetros histopatológicos

Tras la extracción y limpieza del páncreas de cada animal, una pequeña muestra de cada uno fue cortada e inmediatamente sumergida en una solución fijadora Bouin-Hollander durante 24 horas a 4°C.

Posteriormente, se procedió al lavado, deshidratación, transparentado e inclusión de las muestras en parafina, según el siguiente protocolo:

	Compuesto	Tiempo
Lavado en	Etanol 70%	24 horas (3x)
	Etanol 90%	4 horas
	Etanol 100%	8 horas
	Etanol 100%	8 horas

Transparentado en	Etanol 100%-Xileno (1:1)	12 horas
	Xileno	1 hora
	Xileno-Parafina (1:1)	12 horas
Inclusión en	Parafina I	12 horas
	Parafina II	12 horas
	Parafina III	12 horas
Confección del bloque	-	-

Los bloques de parafina fueron cortados en un micrótopo de rotación, en secciones de 8 mm de grosor. Con posterioridad las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas y teñidas con hematoxilina-eosina para su análisis a microscopía óptica, en base al siguiente protocolo:

	Compuesto	Tiempo
Desparafinación en	Xileno	5 minutos
	Xileno	5 minutos
Rehidratación en	Etanol 100%	2 minutos
	Etanol 90%	2 minutos
	Etanol 70%	2 minutos
	Etanol 50%	2 minutos
	Etanol 30%	2 minutos
Lavado en	Agua destilada	2 minutos
Tinción en	Hematoxilina	2 minutos
Lavado en	Agua corriente*	10 minutos
Tinción en	Eosina	8 minutos
Lavado en	Agua destilada	2 minutos
Deshidratación en	Etanol 70%	2 minutos
	Etanol 90%	2 minutos
	Etanol 100%	2 minutos
Lavado en	Xileno	2 minutos
	Xileno	2 minutos
Montaje con Eukit	-	-

* para que hematoxilina vire a tonalidad azul

Por último, se tomaron fotografías de las secciones pancreáticas de ratas sometidas a diferentes tratamientos y ratas control, con el objeto de poner de manifiesto la existencia de signos histológicos relacionados con el proceso inflamatorio característico de la pancreatitis aguda (edema, infiltración leucocitaria, etc.) o, en su caso, la inexistencia o levedad de los mismos.

Todas las secciones fueron observadas mediante microscopía de campo claro en un microscopio Eclipse-600 (Nikon), obteniendo imágenes digitales de las mismas con una cámara AxioCam HRc acoplada al microscopio. Dichas imágenes fueron realizadas a diferentes aumentos utilizando los objetivos 10x, 20x, 40x y 100x y posteriormente optimizadas con el software Adobe Photoshop (v. CS4).

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron expresados en términos de media \pm desviación típica para su análisis mediante el software estadístico GraphPadPrism (GraphPad, San Diego, CA, USA). El nivel de significación establecido fue $\alpha= 0,05$.

Para analizar estadísticamente los resultados obtenidos para cada parámetro estudiado y detectar la existencia de posibles diferencias significativas entre grupos experimentales, se utilizó el test paramétrico de análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido por un test de comparaciones múltiples de Tukey.

Para el caso del análisis realizado para el parámetro sérico corticosterona, fue necesario utilizar un test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn.

4. RESULTADOS

PREÁMBULO

Los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral se exponen a continuación en el formato de publicaciones. Con esta forma de presentar los resultados se pretende aportar una mayor concisión y fidelidad al trabajo experimental desarrollado. Además de la discusión que contiene cada artículo, la cual favorece la interpretación de cada objetivo de investigación planteado, hemos incluido, tras el apartado de resultados, una discusión general de nuestra investigación con la finalidad de dar una visión más completa de nuestros resultados.

PREÂMBULO

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento experimental desta Tese Doutoral são apresentados a seguir no formato de publicações. Esta maneira de apresentar os resultados pretende proporcionar mais concisão e fidelidade ao trabalho experimental desenvolvido. Além da discussão que contém cada artigo, o que favorece a interpretação de cada objetivo da investigação proposta, incluímos, após a secção dos resultados, uma discussão geral da nossa investigação, a fim de dar uma visão mais completa dos nossos resultados.

4.1. Efectos anti-inflamatorios de la melatonina en un modelo de pancreatitis aguda inducido por ceruleína en rata

4.1. Efeitos anti-inflamatórios da melatonina num modelo de pancreatite aguda induzida por ceruleina em rato

4.1. Anti-inflammatory effects of melatonin in a rat model of caerulein-induced acute pancreatitis

Anti-inflammatory effects of melatonin in a rat model of caerulein-induced acute pancreatitis

Cristina Carrasco¹, Ana M. Marchena¹, María S. Holguín-Arévalo², Gervasio Martín-Partido², Ana B. Rodríguez¹, Sergio D. Paredes³ and José A. Pariente^{1*}

¹Department of Physiology, Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Research Group, University of Extremadura, Badajoz, Spain

²Department of Cellular Biology, University of Extremadura, Badajoz, Spain

³Department of Physiology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

The purpose of our study was to evaluate the protective effect of melatonin in a rat model of caerulein-induced acute pancreatitis. For the induction of experimental acute pancreatitis, four subcutaneous injections of caerulein (20 µg kg⁻¹ body weight) were given to Wistar rats at 2-h intervals. Melatonin was injected intraperitoneally (25 mg kg⁻¹ body weight) 30 min before each caerulein injection. After 12 h, rats were sacrificed by decapitation. Blood and pancreas samples were collected and processed for serological and histopathological studies, respectively. Lipase, α-amylase, corticosterone, total antioxidant power and cytokines interleukin (IL)-1β, IL-4 and tumour necrosis factor (TNF)-α were determined using commercial kits. ANOVA and Tukey tests ($P < 0.05$) were performed for the statistical analysis of the results. Results showed that the administration of melatonin reduced histological damage induced by caerulein treatment as well as the hyperamylasemia and hyperlipidemia. Corticosterone and antioxidant total power were also reverted to basal activities. Furthermore, melatonin pre-treatment reduced pro-inflammatory cytokines IL-1β and TNF-α and increased the serum levels of anti-inflammatory cytokine IL-4. In conclusion, the findings suggest that the protective effect of melatonin in caerulein-induced acute pancreatitis is mediated by the anti-inflammatory ability of this indolamine. Thus, melatonin may have a protective effect against acute pancreatitis. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS—melatonin; acute pancreatitis; caerulein; interleukins; inflammatory effects

INTRODUCTION

Acute pancreatitis is a mild oedematous disease, with a possible haemorrhagic and necrotizing evolution and a fatal prognosis.¹ The pathophysiology of this inflammatory illness included tissular oedema, acinar necrosis, perivascular infiltration and haemorrhagia in the pancreas.² It is known that the transition between the mild and the serious form of acute pancreatitis is due to the amplification of the inflammatory response. Thus, spreading from its initial location to the rest of the organism, the generalized inflammation could even culminate in a multisystem organ failure and/or septic complications. In fact, these complications are ultimately responsible for the high mortality and morbidity rates of this illness.^{3,4}

Nowadays, molecular mechanisms of acute pancreatitis are not completely elucidated. Previous studies have confirmed the participation of reactive oxygen species (ROS) at early stages of acute pancreatitis, independently of the underlying aetiology.^{5–8} The overproduction of ROS, besides other toxic species, may exceed the capacity

of the organism's antioxidant system, triggering a cascade of systemic fatal events.⁹ Some of the cellular components, such as lipids, proteins, cytoskeleton¹⁰ and DNA, have been recognized as main targets of oxidative damage.⁶ Additionally, organelles such as mitochondria, fundamental source of ROS in cell, or zymogen granules, which contain the main digestive enzymes secreted by the exocrine pancreas,^{11,12} have shown a high susceptibility to oxidative damage. On the other hand, it has also been speculated that the activation of trypsinogen into trypsin could be produced by the uncontrolled liberation of pancreatic enzymes, leading in acinar degradation, increased vascular permeability and leukocyte infiltration to the injured areas. In this case, the intervention of cytokines and other immunitary mediators could facilitate the systemic dissemination of the inflammatory response, damaging other organs that are localized far from the original focus, such as lungs, liver and kidneys.^{13,14}

On the other hand, melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) was primarily isolated from the pineal gland in 1958.¹⁵ Nevertheless, since this discovery, the synthesis of melatonin has also been detected in other locations such as the gastrointestinal system,¹⁶ where its concentration is estimated to be 400 times higher than the levels found in the pineal gland.¹⁷ Although melatonin is mainly known by the regulation of vital functions such as circadian and circannual cycles,¹⁸

*Correspondence to: José A. Pariente, Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Research Group, Department of Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, 06071, Badajoz, Spain.
E-mail: pariente@unex.es

and seasonal reproduction of some species,¹⁹ it also plays an important antioxidant role, either acting individually, as a non-enzymatic free radicals scavenger, or stimulating antioxidant mechanisms [for example, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)].^{20,21} Furthermore, melatonin stabilizes and protects lipidic membranes against lipoperoxidation phenomenon,²² as well as influences the immune system through the inhibition of NF- κ B transcription factor, related with the production of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 α , IL-6 and tumour necrosis factor (TNF)- α .²³

In the past years, melatonin has been revealed as one of the most promising molecules in the treatment of several inflammatory diseases.^{24,25} For this reason, this study was aimed at assessing the effect of exogenous administration of melatonin during the induction process of acute pancreatitis induced by the cholecystokinin analogue caerulein in rats.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

IL-1 β , TNF- α and IL-4 Bioplex Cytokine Group I Assay kits were supplied by BioRad (Madrid, Spain). Corticosterone solid phase enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) and antioxidant total power commercial assay kits were obtained from DRG Diagnostics (Marburg, Germany) and Cayman Chemical Co (Madrid, Spain), respectively. α -Amylase and lipase colorimetric assay kits were supplied by Spinreact (Girona, Spain). Caerulein was obtained from Sigma Co. (Madrid, Spain), melatonin from Fagron Ibérica (Barcelona, Spain) and ketamine (Imalgen 500[®]) from Merial Laboratories SA (Barcelona, Spain). All others reagents were of analytical grade.

Animal and experimental model

Both male and female Wistar rats (200–300 g of body weight) were obtained from the Animal House of the Faculty of Medicine of the University of Extremadura (Spain). Animals were housed individually in cages under standard conditions at room temperature on a 12-h light:12-h dark cycle with commercial pellet chow and drinking water *ad libitum*. All experiments were performed according to the protocols approved by the Bioethical Committee for Animal Experimentation of the University of Extremadura.

Rats were made to fast for 18 h before the induction of acute pancreatitis. Rats were divided into a control group, a pancreatic group, and a pancreatic group pre-treated with melatonin. To induce acute pancreatitis, one ($\times 1$), two ($\times 2$), three ($\times 3$) or four ($\times 4$) subcutaneous injections of caerulein (20 μ g kg⁻¹ body weight, dissolved in saline solution) or vehicle (saline solution) were given at 2-h intervals, as previously described.²⁶ In the melatonin pre-treatment group, melatonin was injected intraperitoneally (25 mg kg⁻¹ body weight, dissolved in saline solution) 30 min before each caerulein injection. Rats were sacrificed by decapitation 12 h after the final caerulein injection, under sedation by ketamine

(150 mg kg⁻¹ body weight). Blood samples were collected in pre-prepared tubes containing serum-separating gel to determine the serum amylase and lipase activities, cytokine levels, and corticosterone and total antioxidant power. The pancreas was rapidly removed for histopathological studies.

Histological procedures

The pancreas was immediately removed and immersed in Bouin's fluid for 24 h at 4 °C and rinsed with 70% ethanol several times to remove traces of the Bouin's fixative, dehydrated in ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin. Paraffin blocks were cut in a rotatory microtome (Microm, Heidelberg, Germany) at 8- μ m thickness. Paraffin sections were dewaxed in xylol, rehydrated and stained with hematoxylin and eosin. The sections were observed using a brightfield Nikon Eclipse-600 microscope and photographed using a digital camera (Axiocam HRc).

Measurement of α -amylase, lipase, cytokines, corticosterone and total antioxidant power in serum

Serum α -amylase, lipase and total antioxidant power activities were measured using colorimetric assay kits, according to the manufacturers' protocols, using a plate reader. We also performed the ELISA in accordance with the manufacturer's manual using ELISA kits for rat TNF- α , IL-1 β , IL-4 and corticosterone.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Analysis of statistical significance was calculated by using one-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by multiple comparison Tukey's test. The significance level was set at $\alpha=0.05$. For multiple comparisons, one-way ANOVA was used.

RESULTS

To study the effect of exogenous administration of melatonin during the induction process of experimental acute pancreatitis in rats, four subcutaneous injections of caerulein (20 μ g kg⁻¹ body weight) were applied consecutively at 2-h intervals. The severity of caerulein-induced acute pancreatitis was assessed by examining both morphological evidence and histological characteristics. Alternatively, serological studies were performed to better understand the mechanisms involved in the disease.

Classical histological procedures were used to investigate if melatonin attenuated caerulein-induced pancreas damage. Light microscope observations of hematoxylin and eosin stained sections revealed the presence of oedema, inflammatory cell infiltrates and acinar cell degeneration in the pancreas of animals treated with caerulein (pancreatic rats) (Figure 1B–F). Oedema was evidenced by clear space separation of the perilobular interstitium and expansion of the periacinar space causing appreciable separation of acinar structures (Figure 1B–F). The infiltrate was predominantly seen in the interlobular matrix

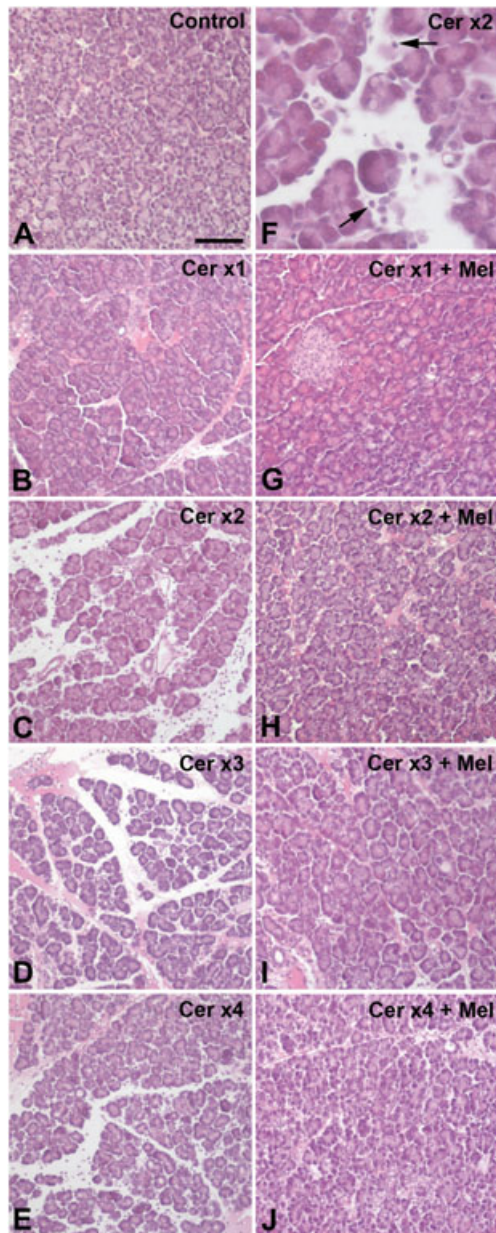


Figure 1. Histological analysis of pancreas from rats treated with caerulein. Rats were injected subcutaneously with one ($\times 1$), two ($\times 2$), three ($\times 3$) or four ($\times 4$) injections of caerulein ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight) at 2-h intervals, and melatonin (25 mg kg^{-1} body weight) was administered intraperitoneally 30 min before each caerulein injection, as indicated in the Materials and Methods section. (A) Non-caerulein-treated control pancreas showed a normal appearance. (B–F) Caerulein treatment caused oedema with expanded interstitial space separating lobules and acini and inflammatory cell infiltrate mainly composed of neutrophils (F). The effects were more intense in animals with repeated injections (C–F). (G–J) Melatonin treatment considerably attenuated the severity of caerulein-induced acute pancreatitis. Scale bar in A denotes $100 \mu\text{m}$ (A–E and G–J), and $35 \mu\text{m}$ (F)

and extended through the parenchymal periacinar spaces (Figure 1B–F) and was composed primarily of neutrophils (Figure 1F). However, melatonin treatment resulted in a decrease of histological signs of acute pancreatitis

(Figure 1G–J), as noted by a similar appearance to the control pancreas (Figure 1A).

The determination of α -amylase and lipase activities is commonly used as biochemical markers of pancreatic pathologies and, particularly, acute pancreatitis. The effects of melatonin on the serum levels of the pancreatic enzymes α -amylase and lipase are shown in Table 1. As expected, treatment with caerulein induced dose-dependent increases in α -amylase and lipase serum levels, a phenomenon typically associated with acute pancreatitis. Compared to the control group, these increased α -amylase and lipase levels were statistically significant, starting from the second injection of caerulein. However, melatonin pre-treatment was able to cause the α -amylase and lipase serum levels to significantly revert from the second injection of caerulein (Table 1), at least in lipase levels.

It is well known that several immunological factors may aggravate acute pancreatitis.²⁷ In this way, $\text{TNF-}\alpha$ and other interleukins could induce acinar cell necrosis, in addition to a local pancreatic injury.¹⁴ Our results show that the treatment with caerulein increased the serum levels of the pro-inflammatory cytokines $\text{IL-1}\beta$ and $\text{TNF-}\alpha$ in pancreatic rats (Table 2). Although these increases did not show a clear relationship with the administered dose of caerulein, they were statistically significant for all doses tested, at least in the case of $\text{TNF-}\alpha$ (Table 2). Moreover, serum levels of anti-inflammatory cytokine IL-4 was significantly and dose-dependently reduced due to the development of caerulein-induced pancreatitis (Table 2). The treatment with melatonin caused the serum concentrations of $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ and IL-4 to significantly revert after the second caerulein injection in the cases of $\text{IL-1}\beta$ and IL-4 and after the first caerulein injection in the case of $\text{TNF-}\alpha$ (Table 2).

Finally, serum activities of total antioxidant power and corticosterone present in rats with caerulein-induced acute pancreatitis are shown in Table 3. Compared to the control group, the concentration of total antioxidant power was significantly reduced by the serial caerulein treatment (Table 3). Likewise, corticosterone levels were significantly increased due to the administration of the cholecystokinin analogue caerulein, from the first injection. Nevertheless, in both cases, melatonin pre-treatment significantly reverted to basal levels the enzymatic activities induced by caerulein (Table 3).

DISCUSSION

Acute pancreatitis is an inflammatory disease with a wide clinical variation, ranging from a self-limiting mild form (75–80% of the cases) to a serious form, which may present multisystem organ failure, sepsis and even death.¹³ Currently, extensive research efforts are focusing on elucidating what mechanisms are involved in the pathophysiology of the disease. According to Braganza (2000),²⁸ there are two main schools of thought: the autodigestion hypothesis, which proposes that acute pancreatitis is due to the activation of trypsin in the acinar cell from the first 10–15 min, and, as other authors support, the hypothesis that a heightened oxidative

Table 1. Serum amylase and lipase levels from rats treated with caerulein

	Amylase (U l ⁻¹)		Lipase (U l ⁻¹)	
	Caerulein	Caerulein + melatonin	Caerulein	Caerulein + melatonin
Control	603.2 ± 118.9		595.6 ± 283.9	
×1	716.9 ± 274.0	807.3 ± 518.3	635.5 ± 330.5	625.7 ± 589.3
×2	2179.2 ± 816.9*	1722.0 ± 473.6*	2358.2 ± 578.1*	1714.7 ± 968.9*
×3	3112.8 ± 371.5*	2659.3 ± 258.2*	2830.2 ± 853.9*	1187.2 ± 603.5*
×4	3965.8 ± 1126.9*	2178.0 ± 642.2*	3338.2 ± 791.5*	1268.7 ± 207.1*

Rats were injected subcutaneously with one (×1), two (×2), three (×3) or four (×4) injections of caerulein (20 µg kg⁻¹ body weight) every 2 h, and melatonin (25 mg kg⁻¹ body weight) was administered intraperitoneally 30 min before each caerulein injection, as indicated in the Materials and Methods section. Data are represented as mean ± SEM (*n* = 6–8).

**P* < 0.05 statistically significant versus control group.

†*P* < 0.05 statistically significant versus melatonin group.

Table 2. Serum cytokines levels, including IL-1β, TNF-α and IL-4, from rats treated with caerulein

	IL-1β (pg ml ⁻¹)		TNF-α (pg ml ⁻¹)		IL-4 (pg ml ⁻¹)	
	Caerulein	Caerulein + melatonin	Caerulein	Caerulein + melatonin	Caerulein	Caerulein + melatonin
Control	1.10 ± 0.27		0.013 ± 0.004		0.041 ± 0.011	
x1	1.10 ± 0.78	1.08 ± 0.63	0.025 ± 0.010*	0.014 ± 0.007	0.037 ± 0.006	0.044 ± 0.010
x2	1.53 ± 0.62*	1.06 ± 0.29	0.028 ± 0.007*	0.017 ± 0.009	0.028 ± 0.009*	0.042 ± 0.009
x3	1.36 ± 0.23*	0.74 ± 0.25*	0.030 ± 0.010*	0.017 ± 0.009	0.022 ± 0.006*	0.031 ± 0.003*
x4	1.65 ± 0.41*	1.10 ± 0.18	0.028 ± 0.004*	0.021 ± 0.009*	0.020 ± 0.005*	0.031 ± 0.008

Rats were injected subcutaneously with one (×1), two (×2), three (×3) or four (×4) injections of caerulein (20 µg kg⁻¹ body weight) every 2 h, and melatonin (25 mg kg⁻¹ body weight) was administered intraperitoneally 30 min before each caerulein injection, as indicated in the Materials and Methods section. Data are represented as mean ± SEM (*n* = 6–8).

**P* < 0.05 statistically significant versus control group.

†*P* < 0.05 statistically significant versus melatonin group.

Table 3. Serum total antioxidant power and corticosterone levels from rats treated with caerulein

	Corticosterone (nM)		Total antioxidant power [Trolox equivalent (mM)]	
	Caerulein	Caerulein + melatonin	Caerulein	Caerulein + melatonin
Control	2285.5 ± 369.9		3.77 ± 1.06	
1	3848.1 ± 729.8*	3239.6 ± 819.4*	1.50 ± 0.28*	1.68 ± 0.48*
x2	4471.7 ± 280.5*	3186.2 ± 1181.8*	1.38 ± 0.99*	2.48 ± 1.01
x3	3500.7 ± 176.6*	2064.1 ± 1126.3	1.14 ± 0.66*	2.52 ± 1.85
x4	4385.7 ± 1324.9*	2707.5 ± 736.6	1.23 ± 0.78*	3.49 ± 0.85

Rats were injected subcutaneously with one (×1), two (×2), three (×3) or four (×4) injections of caerulein (20 µg kg⁻¹ body weight) every 2 h, and melatonin (25 mg kg⁻¹ body weight) was administered intraperitoneally 30 min before each caerulein injection, as indicated in the Materials and Methods section. Data are represented as mean ± SEM (*n* = 6–8).

**P* < 0.05 statistically significant versus control group.

†*P* < 0.05 statistically significant versus melatonin group.

stress, recorded from 5 min in experimental models, could predispose for the development and spread of the disease. From our point of view, there is a lot of evidence about the interrelation between both hypotheses.

First, it is thought that the pancreatic tissue architecture begins to disintegrate as a result of the premature activation of pancreatic enzymes. As was described by Adler *et al.* (1979),²⁹ during the first two days after cessation of the supramaximal stimulation with caerulein, a progressive infiltration of the interstitium and the pancreatic tissue with polymorphonuclear leukocytes, lymphocytes and macrophages occurred, which led to further destruction of the

gland and to decreased functional response. Our histological results, also recorded in previous studies,^{14,30} show that progressive structural alterations are already patent during the first hours from the last caerulein injection and that these appear in a dose-dependent manner. Melatonin pre-treatment recovered the architecture of the gland, in agreement with other studies,^{31,32} probably reducing lipoperoxidation damage and, thus, minimizing increased microvascular permeability and oedema, as it has been observed by some authors.^{30,32,33} The ability to increase pancreatic flow, improving the oxygen metabolism in the tissue, could be another pancrea-protective mechanism of melatonin.³⁴

Some authors have determined the implication of free radicals, especially ROS, in acute pancreatitis, no matter what the aetiology of the disease is.³⁵ It has been observed that the exposition to oxidative stress produces protein damage even before lipoperoxidation,³⁶ increased microvascular permeability³⁷ and high susceptibility to oxidative damage of the isolated zymogen granules.¹² In fact, Niederau *et al.* (1994)¹¹ observed subcellular morphological changes as soon as 10 min after oxidative stress exposition, such as the appearance of vacuoles at the luminal cells site covered by the zymogen granules, where trypsin may be activated. Thus, oxidative stress or, in other words, an insufficiency of antioxidant micronutrients may predispose to illness those individuals with diverse risk factors,²⁸ leading to gland destruction, derived from both enzyme activation and the leukocyte infiltration to the injured area. Once immune cells arrive, their activity would exacerbate the production of harmful free radicals. At the same time, they are synthesizing pro-inflammatory cytokines, which attract more help to the damaged pancreas, worsening the inflammatory status.

Hyperamylasemia and hyperlipidemia have been detected in this and other studies of experimental acute pancreatitis,^{8,38–40} being part of this early phenomenon in the course of caerulein-induced acute pancreatitis. Our results show that melatonin was able to cause amylase and lipase serum concentration to revert to basal levels, that is, to reduce uncontrolled activation and liberation of pancreatic enzymes to bloodstream. This effect in amylase and lipase levels has been already observed in other studies.^{14,32,39} However, other authors point out the contrary effect, at least, in the case of amylase.^{31,41,42} Melatonin is highly lipophilic as well as somewhat hydrophilic, a feature not shared by most antioxidants. This allows it to enter easily in cells and subcellular compartments, where it probably protects a variety of molecules, such as zymogen granules, from oxidative damage.⁴¹

On the other hand, and for the first time, we report that melatonin also causes serum antioxidant biomarkers such as corticosterone and antioxidant total power to revert to control levels. These results support the antioxidant properties of the pineal hormone, *per se* and through the stimulation of antioxidant system. In this sense, it is well known that physiological concentrations of melatonin influence the antioxidant power in human serum.⁴³ Previous reports have described the enhancement of other antioxidant enzymes, such as SOD, CAT and GPx, due to melatonin administration during the course of acute pancreatitis.^{14,33,44}

Finally, our results also confirm the immunoregulatory function of melatonin already seen in other experimental models of acute pancreatitis. In fact, it has been previously reported that exogenous melatonin modulates the balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in some species, such as rats and ringdoves.⁴⁵ Although acute pancreatitis has several aetiologies, the immune system response appears to be identical regardless of the cause, differing only in the degree with which is expressed.⁷ The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines disappears, and this seems to be a crucial factor in the progression of the disease.¹³

This study and other reports have detected that IL-1 β and TNF- α increased serum levels, in both laboratory animal⁴⁶ and human acute pancreatitis.^{47,48} In general, the implication of these pro-inflammatory cytokines, synthesized by all the immune cells attracted to the injured area, in early phases of acute pancreatitis is accepted. In addition, their participation during the later times of the illness, contributing to the systemic spread of the inflammation to other organs,⁴⁹ is proposed. Our results show that, according to previous studies,³² apart from reducing pro-inflammatory cytokines concentration, melatonin pre-treatment increased anti-inflammatory cytokine IL-4. Other anti-inflammatory cytokines have been detected after melatonin treatment in acute pancreatitis, such as IL-10.³² Thus, the ability of indole to immunoregulate the production of some cytokines through the inhibition of NF- κ B transcription factor,^{23,50} which controls the expression of genes involved in immunity and inflammation, production of prostaglandins, cytokines, cell adhesion molecules, nitric oxide and inhibitors of apoptosis⁵⁰ is demonstrated. According to Ramudo *et al.* (2005),²⁶ in an *in vitro* study about cytokine production in acinar cells, the mechanisms involved in the synthesis of these molecules may not have been altered 3 h after the development of acute pancreatitis. Nevertheless, it seems that melatonin would exert this immunoregulatory property in a different way than influences on the acute pancreatitis, limiting the progression of the disease.³²

In the previous years, melatonin has been demonstrated as a promising molecule in the treatment of several diseases. Due to its anti-inflammatory, antioxidant and immunoregulatory properties, it is also thought to be a good candidate in the treatment of acute pancreatitis, avoiding the later complications of the disease, such as necrosis, sepsis and multisystem organ failure. More research efforts must be made to determine the real application of melatonin to human acute pancreatitis, after the successful results observed in melatonin pre-treatment in experimental models.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have declared that there is no conflict of interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Servicio de Apoyo a la Investigación de la UEX (SAIUEX) for its excellent technical assistance. This work was supported by MICINN-FEDER grant BFU2010-15049. C. Carrasco holds a grant from Plan de Formación y Captación de Recursos Humanos en Investigación de la UEx (No. 1076)

REFERENCES

- Bradley EL. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the Atlanta Symposium. *Arch Surg* 1993; **128**: 586–590.
- Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, *et al.* A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; **215**: 44–56.

3. Büchler MW, Gloor B, Müller CA, *et al.* Acute necrotizing pancreatitis: treatment strategy according to the status of infection. *Ann Surg* 2000; **232**: 619–26.
4. Norman J. The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Acute Pancreatitis. *Am J Surg* 1998; **175**: 76–83.
5. Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, *et al.* Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 1999; **377**: 1–11.
6. Jaworek J, Bonio J, Leja-Szpa A, *et al.* Sensory nerves in central and peripheral control of pancreatic integrity by leptin and melatonin. *J Physiol Pharmacol* 2002; **53**: 51–74.
7. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1984; **200**: 405–13.
8. Wisner J, Green D, Ferrell L, *et al.* Evidence for a role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of caerulein induced acute pancreatitis in rats. *Gut* 1988; **29**: 1516–23.
9. Guice KS, Miller DE, Oldham KT, *et al.* Superoxide dismutase and catalase: a possible role in established pancreatitis. *Am J Surg* 1986; **151**: 163–9.
10. Jungermann J, Lerch MM, Weidenbach H, *et al.* Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation. *Am J Physiol* 1995; **268**: G328.
11. Niederau C, Klonowski H, Schulz HU, *et al.* Oxidative injury to isolated rat pancreatic acinar cells vs. isolated zymogen granules. *Free Radic Biol Med* 1996; **20**: 877–86.
12. Schulz HU, Niederau C. Oxidative stress-induced changes in pancreatic acinar cells: insights from in vitro studies. *Hepatogastroenterology* 1994; **41**: 309–12.
13. Wu XN. Current concept of pathogenesis of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2000; **6**: 32–36.
14. Eşrefoğlu M, Gül M, Ates B, *et al.* Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 259–64.
15. Lerner AB, Case JD, Takashi Y, *et al.* Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; **80**: 2587.
16. Huether G, Poeggeler B, Reimer A, *et al.* Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1992; **51**: 945–53.
17. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 2002; **47**: 2336–48.
18. Berger J. A two-clock model of circadian timing in the immune system of mammals. *Pathol Biol* 2008; **56**: 286–91.
19. Barret P, Bolborea M. Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. *J Pineal Res* 2012; **52**: 376–388.
20. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011; **51**: 1–16.
21. Leja-Szpak A, Jaworek J, Tomaszewska R, *et al.* Melatonin precursor; L-tryptophan protects the pancreas from development of acute pancreatitis through the central site of action. *J Physiol Pharmacol* 2004; **55**: 239–54.
22. García JJ, Reiter RJ, Pié J, *et al.* Role of pinole and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr* 1999; **31**: 609–616.
23. Chuang JI, Mohan N, Meltz ML, *et al.* Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell Biol Int* 1996; **20**: 687–692.
24. Motilva V, García-Mauriño S, Talero E, Illanes M. New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin. *J Pineal Res* 2011; **51**: 44–60.
25. Laliena A, San Miguel B, Crespo I, Alvarez M, González-Gallego J, Tuñón MJ. Melatonin attenuates inflammation and promotes regeneration in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res* 2012; **53**: 270–8.
26. Ramudo L, Manso MA, Vicente S, *et al.* Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis. Effect of N-acetyl cysteine. *Cytokine* 2005; **32**: 125–31.
27. Formela LJ, Galloway SW, Kingsnorth AN. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995; **82**: 6–13.
28. Braganza JM. Mast cell: pivotal player in lethal acute pancreatitis. *QJM* 2000; **93**: 469–76.
29. Adler G, Hupp T, Kern HF. Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1979; **382**: 31–47.
30. Ding SP, Li JC, Jin C. A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide. *World J Gastroenterol* 2003; **9**: 584–9.
31. Barlas A, Cevik H, Arbak S, *et al.* Melatonin protects against pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats: role of neutrophils. *J Pineal Res* 2004; **37**: 267–75.
32. Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J, *et al.* Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* 2003; **34**: 40–52.
33. Çöl C, Dinler K, Hasdemir O, *et al.* Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; **9**: 78–82.
34. Jaworek J, Konturek SJ, Tomaszewska R, *et al.* The circadian rhythm of melatonin modulates the severity of caerulein-induced pancreatitis in the rat. *J Pineal Res* 2004; **37**: 161–70.
35. Park BK, Chung JB, Lee JH, *et al.* Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; **9**: 2266–9.
36. Reinheckel T, Nedelev B, Prause J, *et al.* Occurrence of oxidatively modified proteins: an early event in experimental acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 1998; **24**: 393–400.
37. Del Maestro RF, Bjork J, Arfors KE. Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. *Microvasc Res* 1982; **22**: 255–270.
38. Alhan E, Kalyoncu NI, Kural BV, *et al.* Effects of melatonin on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Z Gastroenterol* 2004; **42**: 967–72.
39. Çöl C, Dinler K, Hasdemir AO, *et al.* The effect of an intraperitoneal injection of melatonin on serum amylase levels in acute pancreatitis. *QJM* 2009; **10**: 306–9.
40. Uruñuela A, Sevillano S, de la Mano AM, *et al.* Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1588**: 159–64.
41. Qi W, Tan DX, Reiter RJ, *et al.* Melatonin reduces lipid peroxidation and tissue edema in caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1999; **44**: 2257–62.
42. Sidhu S, Pandhi P, Malhotra S, *et al.* Melatonin treatment is beneficial in pancreatic repair process after experimental acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2010; **628**: 282–9.
43. Benot S, Goberna R, Reiter RJ, Garcia-Mauriño S, Osuna C, Guerrero JM. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. *J Pineal Res* 1999; **27**: 59–64.
44. Jaworek J, Szklarczyk J, Jaworek AK, *et al.* Protective effect of melatonin on acute pancreatitis. *Int J Inflamm* 2012; **2012**: 173675.
45. Delgado J, Terrón MP, Garrido M, *et al.* Jerte Valley cherry-based product modulates serum inflammatory markers in rats and ringdoves. *J Appl Biomed* 2012; **10**: 41–50.
46. Jaworek J, Konturek SJ, Leja-Szpak A, *et al.* Role of endogenous melatonin and its MT2 receptor in the modulation of caerulein-induced pancreatitis in the rat. *J Physiol Pharmacol* 2002; **53**: 791–804.
47. Exley AR, Leese T, Holliday MP, *et al.* Endotoxaemia and serum tumour necrosis factor as prognostic markers in severe acute pancreatitis. *Gut* 1992; **33**: 1126–8.
48. Pezzilli R, Morselli-Labate AM, Miniéro R, *et al.* Simultaneous serum assays of lipase and interleukin-6 for early diagnosis and prognosis of acute pancreatitis. *Clin Chem* 1999; **45**: 1762–7.
49. Rau B, Poch B, Gansauge F, *et al.* Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? *Ann Surg* 2000; **231**: 352–60.
50. Jung KH, Hong SW, Zheng HM, *et al.* Melatonin ameliorates caerulein-induced pancreatitis by modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB in rats. *J Pineal Res* 2010; **48**(3): 239–50.

4.2. Efectos de la melatonina sobre el daño oxidativo y las defensas antioxidantes pancreáticas en un modelo de pancreatitis aguda inducido por ceruleína en rata

4.2. Efeitos da melatonina sobre o dano oxidativo e as defesas antioxidantes pancreáticas num modelo de pancreatite aguda induzida por ceruleina em rato

4.2. Effects of melatonin on the oxidative damage and pancreatic antioxidant defenses in a rat model of cerulein-induced acute pancreatitis

Effects of melatonin on the oxidative damage and pancreatic antioxidant defenses in cerulein-induced acute pancreatitis in rats

Cristina Carrasco, Ana Beatriz Rodríguez and José A Pariente

Badajoz, Spain

BACKGROUND: Oxidative stress is recognized as a pivotal effector of several pathogenic processes, including acute pancreatitis. Reactive oxygen species not just cause damage on the main cellular components, but also influence the expression of antioxidant system genes. Antioxidant molecules, such as melatonin, could be good candidates for the treatment of this multidimensional disease. The present study was to evaluate the chemopreventive effect of melatonin in a rat model of cerulein-induced acute pancreatitis.

METHODS: Four subcutaneous injections of cerulein (20 µg/kg body weight) were given to Wistar rats at two hours intervals; melatonin was injected intraperitoneally (25 mg/kg body weight) 30 minutes before each injection of cerulein. Lipid peroxidation, protein oxidation (carbonyl groups), total antioxidant status, and glutathione peroxidase activity were determined in pancreatic tissue using commercial kits.

RESULTS: The chemopreventive administration of melatonin caused a reduction in lipid peroxidation and protein oxidation due to injections of cerulein. Additionally, melatonin treatment was also able to revert glutathione peroxidase activity and total antioxidant status near to control levels, suggesting that melatonin could prevent from oxidative phenomena in the pancreas, such as lipid peroxidation and protein oxidation, and could stimulate, directly or indirectly, the expression of antioxidant enzymes.

CONCLUSION: Melatonin, a polyvalent antioxidant, protected the pancreatic damage via the decrease of oxidative stress and

increase of the activities of antioxidant enzymes in cerulein-induced acute pancreatitis.

(*Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2014;00:000-000)

KEY WORDS: acute pancreatitis;
antioxidants;
cerulein;
melatonin;
oxidative stress

Introduction

Oxidative stress is recognized as a pivotal effector of several pathogenic processes, including acute pancreatitis.^[1, 2] Imbalance between the antioxidant system of organisms, production of reactive oxygen species (ROS), and other reactive species, could predispose or even directly cause this disease.^[3] Previous studies^[4, 5] showed that some of the main acinar components (lipids, proteins, cytoskeleton and DNA) and organelles (mitochondrion, zymogen granules, etc.) are highly susceptible to oxidative damage; additionally, it has been observed that nuclear factor-kappa B (NF-κB) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activities, transcription factors related to the expression of several genes (e.g. inflammatory mediators, antioxidant enzymes, etc.), are affected by ROS in the pancreas.^[6-8] The acinar cell malfunction and the spread of the local inflammatory status could culminate in a multisystem organ failure and/or septic complications for the patient.^[9]

Many antioxidant families (vitamins, catechins, phytoalexins, carotenoids, etc.) seem to counteract the excessive exposure and/or production of these harmful molecules, acting as direct scavengers and/or indirect regulators of levels of antioxidant enzymes, transcription factors and immunity mediators. For this reason, antioxidant supplementation is gathering force in clinical practice as a possible option in the treatment of

Author Affiliations: Department of Physiology, Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Research Group, University of Extremadura, Badajoz 06006, Spain (Carrasco C, Rodríguez AB and Pariente JA)

Corresponding Author: José A Pariente, PhD, Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Research Group; Department of Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, Badajoz 06006, Spain (Tel: 34-924-289300ext86956; Fax: 34-924-289388; Email: pariente@unex.es)

© 2014, Hepatobiliary Pancreat Dis Int. All rights reserved.

doi:

Published online ??, 2014.

Check the address!

several diseases.^[10, 11] Melatonin,^[12, 13] resveratrol^[14-16] and lycopene^[17, 18] between other antioxidant components found in food, have demonstrated their usefulness in the management of inflammatory illness such as acute pancreatitis, at least in animal models. Effectiveness and lack of secondary effects at low doses are some of the strong points of this kind of natural molecules.^[19]

Taking in account the observed implication of ROS in the pathophysiology of acute pancreatitis and the effectiveness of melatonin to counteract its deleterious effects, the purpose of this study was to evaluate the effect of exogenous administration of melatonin on the pancreatic oxidative status and structural phenomena, during the induction process of the disease caused by the cholecystokinin-analogue cerulein in rats.

Methods

Reagents

Lipid peroxidation and antioxidant total status commercial assay kits were supplied by Oxford Biomedical Research (Barcelona, Spain). Protein carbonyl and glutathione peroxidase assay kits were from Cayman Chemical Co. (Madrid, Spain). Cerulein was from Sigma Co. (Madrid, Spain), melatonin from Fagron Ibérica (Barcelona, Spain) and ketamine (Imalgen 500®) from Merial Laboratories SA (Barcelona, Spain). All other reagents were of analytical grade.

Animal and experimental model

Six-week-old male and female Wistar rats (150-200 g of body weight) were obtained from the Animal House of the Faculty of Medicine of University of Extremadura. The rats were housed individually in cages under standard conditions at room temperature on a 12-hour light/12-hour dark cycle with commercial pellet chow and drinking water *ad libitum*. All experiments were performed according to the protocols approved by the Bioethical Committee for Animal Experimentation of the University of Extremadura.

The rats were divided into a control group, a pancreatitis group and a treatment group. After 18-hour fasting, the rats were subcutaneously injected with cerulein (20 µg/kg body weight) or saline solution for four times at 2-hour intervals, as previously described.^[12] In the treatment group, melatonin was injected intraperitoneally (25 mg/kg body weight, dissolved in saline solution) 30 minutes before each cerulein injection. The rats were killed by decapitation 12 hours after the final cerulein injection, under sedation by ketamine (150 mg/kg body weight). Pancreases of the

rats were quickly removed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C for later oxidative stress studies.

Measurement of lipid peroxidation, protein oxidation, glutathione peroxidase activity and total antioxidant status in pancreatic tissue

After pancreatic extractions, 0.1 g of tissue specimens were homogenized in 1 mL of a particular buffer (according to the protocols of used kits) and placed on ice until their use. Determinations were corrected for the protein content of the tissue by the Bradford method.^[20]

To determine pancreatic lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA) concentration was measured in the homogenates; as a product of fatty acid decomposition, MDA reacts with N-methyl-2-phenylindole at 45 °C, resulting in a stable chromophore with a maximal absorbance of 586 nm. The data were expressed in terms of **µmol/mg total protein of MDA**.

Protein oxidation was studied by measuring carbonyl groups in the homogenates; these groups were formed by metal-catalyzed protein oxidation and quantified via their reaction with 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). The resulting hydrazone was analyzed spectrophotometrically at 385 nm. The data were expressed in **nmol/mL of protein carbonyl groups**.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was indirectly measured in the homogenates, via a coupled reaction with glutathione reductase and oxidized glutathione; in this reaction, the oxidation of NADPH causes a reduction in absorbance at 340 nm which is proportional to GPx activity in the sample. The data were expressed in terms of **nmol/min/mL of GPx activity**.

Finally, total antioxidant status was determined as the power of the sample to reduce copper ion. Reduced copper (Cu¹⁺) formed a stable complex with a chromogen, which has a maximal absorbance at 450 nm. The data were expressed as **µmol/L of Trolox equivalents**.

Statistical analysis

The data were expressed as mean±SEM. Statistical significance was calculated by using the one-way ANOVA, followed by Tukey's procedure for multiple comparison. A *P*<0.05 was considered statistically significant.

Results

MDA concentration was significantly increased in the cerulein-treated rats (pancreatitis group) compared to the non-treated group (control group) (Fig. 1, *P*<0.05); melatonin administration significantly reduced the levels of MDA (*P*<0.05) (Fig. 1). Protein oxidation



Effects of melatonin on the pancreatic oxidative stress in acute pancreatitis

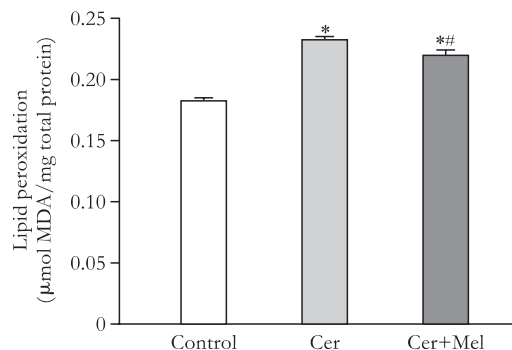


Fig. 1. Lipid peroxidation in pancreatic samples. Rats were injected subcutaneously with four injections of cerulein (Cer) (20 µg/kg body weight) (pancreatitis group) or vehicle (saline solution) (control group) at 2-hour intervals, and melatonin (Cer+Mel) (25 mg/kg body weight) (treatment group) was administered intraperitoneally 30 minutes before each cerulein injection, as indicated in the Methods section. Data are represented as mean±SEM ($n=6-8$). *: $P<0.05$, versus control group; #: $P<0.05$, versus pancreatitis group.

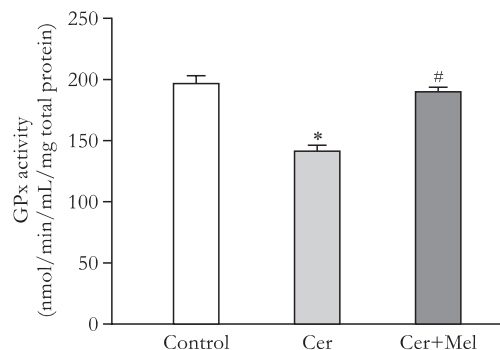


Fig. 3. GPx activity in pancreatic samples. Rats were injected subcutaneously with four injections of cerulein (Cer) (20 µg/kg body weight) (pancreatitis group) or vehicle (saline solution) (control group) at 2-hour intervals, and melatonin (Cer+Mel) (25 mg/kg body weight) (treatment group) was administered intraperitoneally 30 minutes before each cerulein injection, as indicated in the Methods section. Data are represented as mean±SEM ($n=6-8$). *: $P<0.05$, versus control group; #: $P<0.05$, versus pancreatitis group.

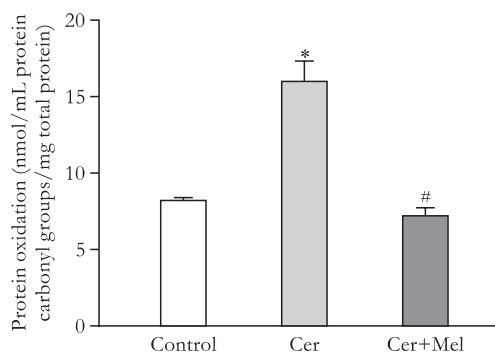


Fig. 2. Protein oxidation in pancreatic samples. Rats were injected subcutaneously with four injections of cerulein (Cer) (20 µg/kg body weight) (pancreatitis group) or vehicle (saline solution) (control group) at 2-hour intervals, and melatonin (Cer+Mel) (25 mg/kg body weight) (treatment group) was administered intraperitoneally 30 minutes before each cerulein injection, as indicated in the Methods section. Data are represented as mean±SEM ($n=6-8$). *: $P<0.05$, versus control group; #: $P<0.05$, versus pancreatitis group.

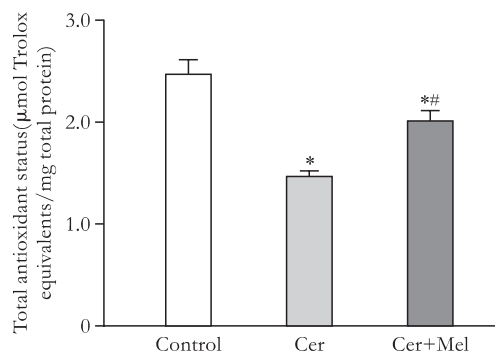


Fig. 4. Total antioxidant status in pancreatic samples. Rats were injected subcutaneously with four injections of cerulein (Cer) (20 µg/kg body weight) (pancreatitis group) or vehicle (saline solution) (control group) at 2-hour intervals, and melatonin (Cer+Mel) (25 mg/kg body weight) (treatment group) was administered intraperitoneally 30 minutes before each cerulein injection, as indicated in the Methods section. Data are represented as mean±SEM ($n=6-8$). *: $P<0.05$, versus control group; #: $P<0.05$, versus pancreatitis group.

(expressed by protein carbonyl content) was significantly increased in the pancreatitis group compared with the control group, and melatonin injection significantly prevented protein oxidation (Fig. 2, $P<0.05$). GPx activity was significantly lower in the pancreatitis group than in the control group (Fig. 3, $P<0.05$). Melatonin administration significantly increased the enzymatic activity (Fig. 3, $P<0.05$). Compared to the control group, cerulein administration significantly decreased pancreatic total antioxidant status (Fig. 4, $P<0.05$). Moreover, exogenous administration of melatonin increased significantly pancreatic total antioxidant status in cerulein-treated rats (Fig. 4, $P<0.05$).

Discussion

Since Sanfey et al^[21] pointed out the implication of ROS in the pathophysiology of acute pancreatitis, many *in vitro* and *in vivo* studies have confirmed the participation of these highly reactive molecules in the development of the disease. Nevertheless, it is not well understood if free radicals act as initiators or amplifiers of the inflammatory event.^[5]

ROS levels as well as the levels of other reactive species resulting from normal cell metabolism are usually balanced by the action of the antioxidant system. Thus, the first line of defense is composed by detoxifying enzymes, superoxide dismutase, catalase

and GPx. These enzymes metabolize potentially harmful molecules to innocuous byproducts. Loss of equilibrium between oxidants/antioxidants levels in the organism is a situation known as oxidative stress. It has been observed that multiple factors are responsible for the expression and activity of the enzymatic antioxidant system; oxidative status is considered to be the main regulator factor.^[22] Without enough defenses, ROS causes structural damages (lipid peroxidation, protein oxidation, etc.) and, consequently, cell dysfunction which leads to some diseases such as acute pancreatitis.^[23]

This study confirmed the implication of reactive species at early stage of cerulein-induced acute pancreatitis in rats. In general, it is thought that NADPH oxidase is the major source of ROS in human cells and, in particular, in this experimental model.^[8, 24] Free radicals could attack some cell components, mainly lipids and proteins. In the present study, MDA levels as well as modified proteins levels were increased in the pancreatitis group. However, concentrations of these markers were diminished in the treatment group, showing the protective effect of the exogenous administration of **indolamine** on these harmful structural phenomena. Other studies^[6, 25-27] demonstrated the capacity of melatonin to counteract lipid peroxidation in pancreatic tissue as well as in other antioxidant molecules.^[14, 17, 28-30] Hence, antioxidant treatment protects not just fatty acids in acinar cell membrane, but also zymogen granules integrity and other intracellular lipid structures. As a result, lipid peroxidation-induced toxicity such as increased membrane fluidity, cytosolic efflux, loss of membrane protein activity and even cell death,^[4] are minimized. This fact is of importance in the management of inflammatory response, considering that fatty acids of cell membranes are precursors of inflammatory mediators (e.g. prostaglandins).^[31] Additionally, lipid peroxidation in the endothelial layer of capillaries and venules is also reduced.^[32] At the same time, the dysfunction of membrane proteins, derived from the lipid peroxidation phenomenon, is aggravated for the direct attack of ROS to these essential cellular components. The present study is the first to show that melatonin pre-treatment diminished elevated levels of carbonyl groups in a cerulein-induced acute pancreatitis. This protective effect was also demonstrated in different animal models.^[33, 34] Thus, protein oxidation is another early event that could be prevented by antioxidant before treatment.

Obviously, the antioxidant defense system is also affected during the development of acute pancreatitis, aggravating the progression of the disease. In agreement

with the previous studies,^[6, 27] our results showed that GPx levels are depressed during acute pancreatitis. Moreover, total antioxidant status seems to be reduced in rats treated with cerulein; thus, in our study the pancreatitis group had a compromised antioxidant capacity compared with the other two groups. Nevertheless, this work confirmed that pre-treatment with melatonin was able to make the concentration of these biomarkers in pancreatic tissue return to the control levels. It has been documented that melatonin regulates antioxidant defense expression^[23] through influence on the function of important transcription factors such as NF-κB.^[6] Franco et al^[22] pointed out that the response of antioxidant enzyme genes to oxidative stress differs in a tissue specific manner. The balance between positive and negative regulatory factors determines different patterns of gene induction according to oxidative stimuli and tissues. On the other hand, stimulation *in vitro* of antioxidant enzyme genes occurs at nanomolar concentration of melatonin in cell culture, being far from the non-physiological doses administered to rats in experimental models of acute pancreatitis.^[23] Thus, antioxidant effect of melatonin in acute pancreatitis is related not just to its scavenger abilities, but also to a direct stimulation of antioxidant defense expression.

In conclusion, the imbalance of oxidative stress and antioxidants plays an important role in cerulein-induced acute pancreatitis. Melatonin, a polyvalent antioxidant, significantly decreases oxidative stress and increases the activities of antioxidant enzymes in the pancreatitis model of rats while protecting from pancreatic damage.

Acknowledgement: Cristina Carrasco holds a research from ~~Plan de Captación y Formación de Recursos Humanos en Investigación de la UEx (n° 1076)~~.

Contributors: PJA proposed the study. CC and RAB performed research and wrote the first draft. CC collected and analyzed data. All authors contributed to the design and interpretation of the study and to further drafts. PJA is the guarantor.

Funding: This study was supported by grants from MICINN-FEDER (BFU2010-15049) and Gobierno de Extremadura (Re: GRU10003).

Ethical approval: The study was approved by Bioethical Committee for Animal Experimentation of the University of Extremadura.

Competing interest: No benefits in any form have been received or will be received from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this article.

References

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

Effects of melatonin on the pancreatic oxidative stress in acute pancreatitis

- 2 Leung PS, Chan YC. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:135-165.
- 3 Park BK, Chung JB, Lee JH, Suh JH, Park SW, Song SY, et al. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2266-2269.
- 4 Armstrong JA, Cash N, Soares PM, Souza MH, Sutton R, Criddle DN. Oxidative stress in acute pancreatitis: lost in translation? *Free Radic Res* 2013;47:917-933.
- 5 Closa D. Free radicals and acute pancreatitis: much ado about ... something. *Free Radic Res* 2013;47:934-940.
- 6 Jung KH, Hong SW, Zheng HM, Lee HS, Lee H, Lee DH, et al. Melatonin ameliorates cerulein-induced pancreatitis by the modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB in rats. *J Pineal Res* 2010;48:239-250.
- 7 Kim H, Seo JY, Roh KH, Lim JW, Kim KH. Suppression of NF-kappaB activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med* 2000;29:674-683.
- 8 Yu JH, Kim H. Role of janus kinase/signal transducers and activators of transcription in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gut Liver* 2012;6:417-422.
- 9 Ramudo L, Manso MA, Vicente S, De Dios I. Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis. Effect of N-acetyl cysteine. *Cytokine* 2005;32:125-131.
- 10 Fantini L, Tomassetti P, Pezzilli R. Management of acute pancreatitis: current knowledge and future perspectives. *World J Emerg Surg* 2006;1:16.
- 11 Esrefoglu M. Experimental and clinical evidence of antioxidant therapy in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2012;18:5533-5541.
- 12 Carrasco C, Marchena AM, Holguín-Arévalo MS, Martín-Partido G, Rodríguez AB, Paredes SD, et al. Anti-inflammatory effects of melatonin in a rat model of caerulein-induced acute pancreatitis. *Cell Biochem Funct* 2013;31:585-590.
- 13 Jaworek J, Szklarczyk J, Jaworek AK, Nawrot-Porąbka K, Leja-Szpak A, Bonior J, et al. Protective effect of melatonin on acute pancreatitis. *Int J Inflam* 2012;2012:173675.
- 14 Carrasco C, Holguín-Arévalo MS, Martín-Partido G, Rodríguez AB, Pariente JA. Chemopreventive effects of resveratrol in a rat model of cerulein-induced acute pancreatitis. *Mol Cell Biochem* 2014;387:217-225.
- 15 Li ZD, Ma QY, Wang CA. Effect of resveratrol on pancreatic oxygen free radicals in rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006;12:137-140.
- 16 Szabolcs A, Varga IS, Varga C, Berkó A, Kaszaki J, Letoha T, et al. Beneficial effect of resveratrol on cholecystokinin-induced experimental pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2006;532:187-193.
- 17 Ozkan E, Akyüz C, Dulundu E, Topaloğlu U, Sehirli AO, Ercan F, et al. Protective effects of lycopene on cerulein-induced experimental acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* 2012;176:232-238.
- 18 Kang M, Park KS, Seo JY, Kim H. Lycopene inhibits IL-6 expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Genes Nutr* 2011;6:117-123.
- 19 Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci* 2004;82:614-619.
- 20 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- 21 Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1984;200:405-413.
- 22 Franco AA, Odom RS, Rando TA. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1122-1132.
- 23 Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004;36:1-9.
- 24 Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13659.
- 25 Col C, Dinler K, Hasdemir O, Buyukasik O, Bugdayci G. Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010;9:78-82.
- 26 Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J, Nawrot K, Tomaszewska R, Stachura J, et al. Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* 2003;34:40-52.
- 27 Jaworek J, Zwirska-Korcza K, Szklarczyk J, Nawrot-Porąbka K, Leja-Szpak A, Jaworek AK, et al. Pinealectomy aggravates acute pancreatitis in the rat. *Pharmacol Rep* 2010;62:864-873.
- 28 Zhang DQ, Feng H, Chen WC. Effects of hydrogen-rich saline on taurocholate-induced acute pancreatitis in rat. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:731932.
- 29 Carvalho KM, Morais TC, de Melo TS, de Castro Brito GA, de Andrade GM, Rao VS, et al. The natural flavonoid quercetin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Biol Pharm Bull* 2010;33:1534-1539.
- 30 Lima PR, de Melo TS, Carvalho KM, de Oliveira íB, Arruda BR, de Castro Brito GA, et al. 1,8-cineole (eucalyptol) ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis via modulation of cytokines, oxidative stress and NF-κB activity in mice. *Life Sci* 2013;92:1195-1201.
- 31 Kuliaviene I, Gulbinas A, Cremers J, Pundzius J, Kupcinskas L, Dambrauskas Z, et al. Fatty acids of erythrocyte membrane in acute pancreatitis patients. *World J Gastroenterol* 2013;19:5678-5684.
- 32 Qi W, Tan DX, Reiter RJ, Kim SJ, Manchester LC, Cabrera J, et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and tissue edema in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1999;44:2257-2262.
- 33 Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci* 2003;72:2707-2718.
- 34 Atilgan D, Parlaktas BS, Uluocak N, Erdemir F, Firat F, Erkorukmaz U, et al. Effects of melatonin on partial unilateral ureteral obstruction induced oxidative injury in rat kidney. *Urol Ann* 2012;4:89-93.

Received January 27, 2014

Accepted after revision April 20, 2014

4.3. Efectos quimiopreventivos del resveratrol en un modelo de pancreatitis aguda inducido por ceruleína en rata

4.3. Efeitos quimiopreventivos do resveratrol num modelo de pancreatite aguda induzida por ceruleina em rato

4.3. Chemopreventive effects of resveratrol in a rat model of cerulein-induced acute pancreatitis

Chemopreventive effects of resveratrol in a rat model of cerulein-induced acute pancreatitis

Cristina Carrasco · María S. Holguín-Arévalo ·
Gervasio Martín-Partido · Ana B. Rodríguez ·
José A. Pariente

Received: 30 July 2013 / Accepted: 5 November 2013 / Published online: 15 November 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract In the past decades, a greater understanding of acute pancreatitis has led to improvement in mortality rates. Nevertheless, this disease continues to be a health care system problem due to its economical costs. Future strategies such as antioxidant supplementation could be very promising, regarding to beginning and progression of the disease. For this reason, this study was aimed at assessing the effect of exogenous administration of resveratrol during the induction process of acute pancreatitis caused by the cholecystokinin analog cerulein in rats. Resveratrol pretreatment reduced histological damage induced by cerulein treatment, as well as hyperamylasemia and hyperlipidemia. Altered levels of corticosterone, total antioxidant status, and glutathione peroxidase were significantly reverted to control levels by the administration of resveratrol. Lipid peroxidation was also counteracted; nevertheless, superoxide dismutase enzyme was overexpressed due to resveratrol pretreatment. Related to immune response, resveratrol pretreatment reduced pro-inflammatory cytokine IL-1 β levels and increased anti-inflammatory cytokine IL-10 levels. In addition, pretreatment with resveratrol in cerulein-induced pancreatitis rats was able to reverse, at least partially, the abnormal calcium signal induced by treatment with cerulein. In conclusion, this study confirms antioxidant and immunomodulatory

properties of resveratrol as chemopreventive in cerulein-induced acute pancreatitis.

Keywords Resveratrol · Acute pancreatitis · Cerulein · Interleukins · Antioxidants

Introduction

Acute pancreatitis is an inflammatory disease with a wide clinical variation, ranging from self-limiting mild form (75–80 % of the cases) to serious form, which may present multisystem organ failure, sepsis, and even death [1]. Nowadays, the treatment of this illness is limited to palliative cares such as monitoring of vital signs, arterial oxygen saturation, and hydration status of the patient, as well as analgesic therapy [2]. In patients with poor prognosis, antibiotics and/or surgery are also recommended to avoid necrosis [3]. In addition, the treatment of human severe acute pancreatitis with some promising molecules such as lexipafant [4], a powerful platelet activating factor (PAF) antagonist, had not shown to be effective against systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and organ failure, responsible for the high mortality and morbidity rates of this illness [5].

Previous studies have confirmed the participation of reactive oxygen species (ROS) at early stages of acute pancreatitis, independently of the underlying etiology [6, 7]. It is supposed that an imbalance between the production of free radicals and the antioxidant system of an organism would predispose to acute pancreatitis. Afterward, premature activation of pancreatic enzymes, leukocyte infiltration, and cytokine production could aggravate local injury and produce the spread of the inflammation to the rest of the organism [8–11].

C. Carrasco · A. B. Rodríguez · J. A. Pariente (✉)
Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Research Group,
Department of Physiology, Faculty of Science, University of
Extremadura, 06006 Badajoz, Spain
e-mail: pariente@unex.es

M. S. Holguín-Arévalo · G. Martín-Partido
Department of Cellular Biology, University of Extremadura,
Badajoz, Spain

Some antioxidants have been shown to be effective in animal models of acute pancreatitis induced by both cerulein and bile-pancreatic duct obstruction, such as melatonin [12, 13] and lycopene [14]. In fact, it is well known that resveratrol has antioxidant properties by scavenging biological generated radicals, likely due to its phenolic groups [15] and its amphipathic character [16]. Furthermore, this phytoalexin has demonstrated to have an immunomodulatory capacity through different mechanisms and cellular targets [17, 18]. The presence of resveratrol in vegetables and fruits, or food products such as wine [19], make it a good candidate in the treatment of oxidative and/or inflammatory diseases.

For this reason, this study was aimed at assessing the effect of exogenous administration of resveratrol during the induction process of acute pancreatitis caused by the cholecystokinin analog cerulein in rats.

Materials and methods

Reagents

IL-1 β and IL-10 Bioplex Cytokine Group I Assay kits were supplied by BioRad (Madrid, Spain). Corticosterone solid phase enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) and lipid peroxidation assay kit were obtained from DRG Diagnostics (Marburg, Germany) and Oxford Biomedical Research (Barcelona, Spain), respectively. Total antioxidant status (TAS), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) assay kits were obtained from Cayman Chemical Co. (Madrid, Spain). α -Amylase and lipase colorimetric assay kits were supplied by Spinreact (Girona, Spain). Cerulein and resveratrol were obtained from Sigma Co. (Madrid, Spain) and ketamine (Imalgen 500[®]) from Merial Laboratories S.A. (Barcelona, Spain). Collagenase CLSPA was obtained from Worthington Biochemical Corporation (USA) and Fura-2-AM from Molecular Probes Europe (Netherlands). All others reagents were of analytical grade.

Animal and experimental model

Both male ($n = 6$) and female ($n = 32$) Wistar rats (150–200 g of body weight) were obtained from the Animal House of the Faculty of Medicine of the University of Extremadura (Spain). Animals were housed individually in cages under standard conditions at room temperature on a 12-h light:12-h dark cycle with commercial pellet chow and drinking water ad libitum. All experiments were performed according to the protocols approved by the Bioethical Committee for Animal Experimentation of the University of Extremadura.

Rats were divided into control group, pancreatitis group, and pancreatitis group pretreated with resveratrol. After 18 h fasting, to induce acute pancreatitis, four subcutaneous injections of cerulein (20 mg kg⁻¹ body weight, dissolved in saline solution) or vehicle (saline solution) were given at 2-h intervals, as previously described [20]. In the resveratrol pretreatment group, resveratrol was injected intraperitoneally (10 mg kg⁻¹ body weight, dissolved in ethanol 70 %, previously to dissolution in saline solution) 30 min before each cerulein injection. Rats were humanely killed by decapitation 12 h after the final cerulein injection, under sedation by ketamine (150 mg kg⁻¹ body weight). Blood samples were collected in pre-prepared tubes containing serum-separating gel to determine the serum amylase and lipase activities and cytokines, corticosterone and TAS levels. Pancreases were rapidly removed for histopathological studies, and measurement of enzymatic antioxidant activities and cytosolic free calcium concentration ([Ca²⁺]_c).

Preparation of pancreatic acinar cells

A suspension of single cells and small acini was prepared from each rat pancreas by enzymatic dispersion as described previously [21]. Pancreases were quickly removed and placed in physiological solution containing (in mM): NaCl 140, KCl 4.7, CaCl₂ 1.2, MgCl₂ 1.1, glucose 10 and Hepes 10, pH 7.4. During the isolation procedure, 0.1 % soybean trypsin inhibitor was added. Once fatty tissue and big blood vessel were removed, the pancreas was injected with a collagenase solution (200 U mL⁻¹) and incubated for 5–10 min at 37 °C under gentle agitation. The enzymatic digestion of the tissue was followed by gently pipetting the cell suspension through tips of decreasing diameter for mechanical dissociation of the acinar cells.

Histological procedures

A piece of each pancreas was immediately cut and immersed in Bouin's fluid for 24 h at 4 °C and rinsed with 70 % ethanol several times to remove traces of the Bouin's fixative, dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and embedded in paraffin. Paraffin blocks were cut in a rotatory microtome (Microm, Heidelberg, Germany) at 8-mm thickness. Paraffin sections were dewaxed in xylol, rehydrated, and stained with hematoxylin and eosin. The sections were observed using a brightfield Nikon Eclipse-600 microscope and photographed using a digital camera (Axiocam HRc).

Measurement of α -amylase, lipase, cytokines, corticosterone and TAS values in serum

Serum α -amylase, lipase, and TAS activities were measured using colorimetric assay kits; IL-1 β , IL-10 and corticosterone levels were determined using ELISA kits. All of them were performed in accordance with the manufacturer's manuals.

Measurement of lipid peroxidation, GSH-Px, and SOD values in pancreas

Tissue lipid peroxidation, GSH-Px and SOD values were measured in homogenates of pancreatic tissue using colorimetric assay kits, according to the manufacturer's protocol, at wavelengths of 586, 340, and 450 nm, respectively. Lipid peroxidation was expressed in terms of malondialdehyde (MDA) concentration and corrected for the protein content of the tissue by Bradford method [22].

Measurement of cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$)

Cells were loaded with Fura-2 by incubation with 4 μ M Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2 AM) for 30 min at room temperature, according to a procedure published elsewhere [23]. Once loaded, cells were washed and used within the next 2–4 h. Fluorescence was recorded from 2 mL aliquots of magnetically stirred cellular suspension (2×10^8 cells mL $^{-1}$) at 37 °C by using a spectrofluorometer with excitation wavelengths of 340 and 380 nm and emission at 505 nm. Changes in $[Ca^{2+}]_c$ were monitored by using the Fura-2 340/380 nm fluorescence ratio and were calibrated according to the method of Grynkiewicz et al. [24].

Calcium release was estimated using the integral of the rise in $[Ca^{2+}]_c$ for 2.5 min after addition of CCK-8 [25]. Calcium release is expressed as nanomolar taking a sample every second (nM s), as previously described [26].

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Analysis of statistical significance was calculated by using one-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by multiple comparison Tukey's test; in the case of corticosterone, the statistical analysis performed was Kruskal–Wallis test, followed by multiple comparison Dunn's test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The significance level was set at $\alpha = 0.05$.

Results

To study the effects of exogenous administration of resveratrol during the induction process of experimental acute pancreatitis in rats, histopathological, biochemical and immunological analyses were performed in serum and/or pancreatic tissue, as described below.

Classical histological procedures were used to investigate if resveratrol was able to attenuate cerulein-induced pancreas damage. As expected, the optical microscope observation of stained sections of hematoxylin and eosin revealed that none of the control pancreases showed presence of inflammatory cells; in fact, both endocrine islets (not shown) and exocrine acini appeared normal (Fig. 1a, b). In the pancreatitis group, the pancreatic samples showed the presence of edema, inflammatory cell infiltrates and disruption of the acinar cell architecture (Fig. 1c–e). Edema was evidenced by clear space separation of the perilobular interstitium and expansion of the periacinar space (Fig. 1c, d). The infiltrate was predominantly seen in the interlobular matrix and was extended through the periacinar parenchymal spaces (Fig. 1c–e); the majority of cells were neutrophils (Fig. 1e), although macrophages and eosinophils were also observed in a minor extent (not shown). However, resveratrol treatment resulted in a decrease of histological signs of acute pancreatitis (Fig. 1f, g), as noted by a similar appearance to the control pancreases.

On the other hand, serum analysis was focused to determine several aspects of the pathophysiology of acute pancreatitis. Firstly, α -amylase and lipase activities were measured due to their importance as biochemical markers of pancreatic pathologies. In pancreatitis group, both enzymatic levels were found to be significantly higher ($P < 0.05$) than those in control group (Fig. 2a, b); however, resveratrol pretreatment was able to revert, in a statistically significant manner ($P < 0.05$), these marked rises (Fig. 2a, b). Secondly, serum levels of some antioxidant markers were studied, such as corticosterone and TAS. Concentration of corticosterone in rats treated only with cerulein (pancreatitis group) increased significantly, compared to control group (Fig. 3a). Nevertheless, previous administration of resveratrol was able to counteract significantly ($P < 0.05$) the effect of cerulein, maintaining corticosterone levels similar to control levels (Fig. 3a). Regarding to TAS, administration of cerulein to pancreatitis group significantly ($P < 0.05$) reduced its serum concentration; on the contrary, resveratrol pretreatment reverted significantly ($P < 0.05$) this reduction in TAS concentration, caused by the development of cerulein-induced pancreatitis (Fig. 3b). Finally, in order to test the immunomodulatory effect of resveratrol, we also measured pro- and anti-inflammatory cytokines in serum, such as IL-1 β and IL-10, respectively. Compared to control group,

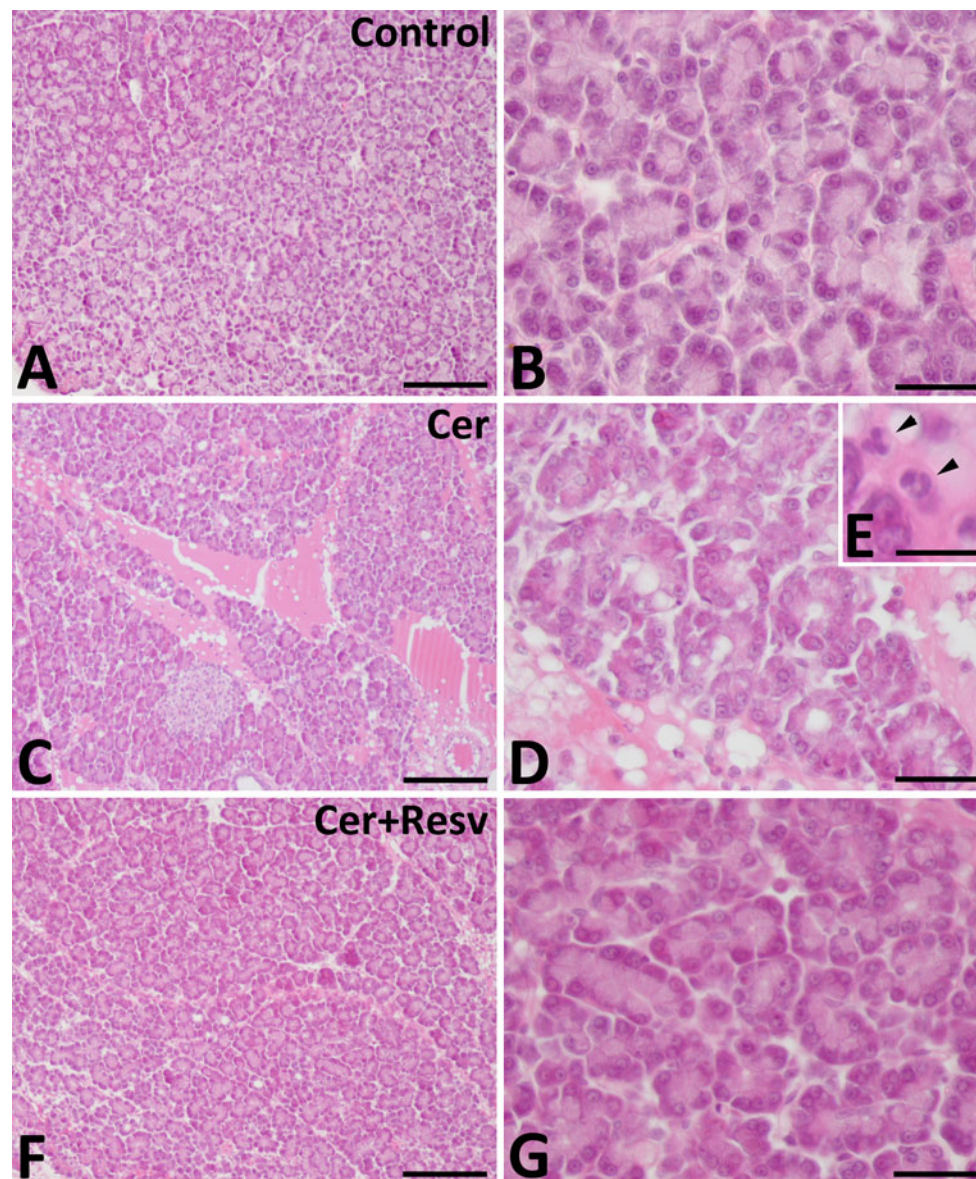


Fig. 1 Histological analysis of pancreas. Rats were injected subcutaneously with four injections of cerulein (Cer) (20 mg kg^{-1} body weight) or vehicle (saline solution) at 2-h intervals, and resveratrol (Resv) (10 mg kg^{-1} body weight) was administered intraperitoneally 30 min before each cerulein injection, as indicated in the “Materials and methods” section. **a, b** Control pancreases showed a normal appearance. **c–e** Cerulein treatment caused edema evidenced by a

clear space in the perilobular interstitium and expansion of the periacinar space; an infiltrate of inflammatory cells, mainly composed of neutrophils, was also observed (**e**). **f, g** Resveratrol pretreatment considerably attenuated the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. Scale bars denote $200 \mu\text{m}$ in **a, c, f**; $50 \mu\text{m}$ in **b, d, g**; and $25 \mu\text{m}$ in **e**

whereas levels of IL- 1β in pancreatitis group were founded to be significantly higher ($P < 0.05$), exogenous administration of resveratrol significantly reduced ($P < 0.05$) the concentration of this pro-inflammatory cytokine (Fig. 4a). Surprisingly, IL-10 levels founded in pancreatitis group were similar to those in control group, whereas pretreatment with resveratrol increased significantly serum levels of this anti-inflammatory cytokine, compared to control and pancreatitis groups (Fig. 4b).

Moreover, tisular antioxidant effects of resveratrol were studied. The measurement of antioxidant markers in pancreatic tissue revealed that lipid peroxidation, in terms of MDA concentrations, was significantly higher ($P < 0.05$) in pancreatitis group, compared to control group (Fig. 5a). In contrast, exogenous administration of resveratrol reduced significantly MDA levels compared to pancreatitis group, even below control levels (Fig. 5a). Additionally, GSH-Px activity was slightly reduced in pancreatitis group,

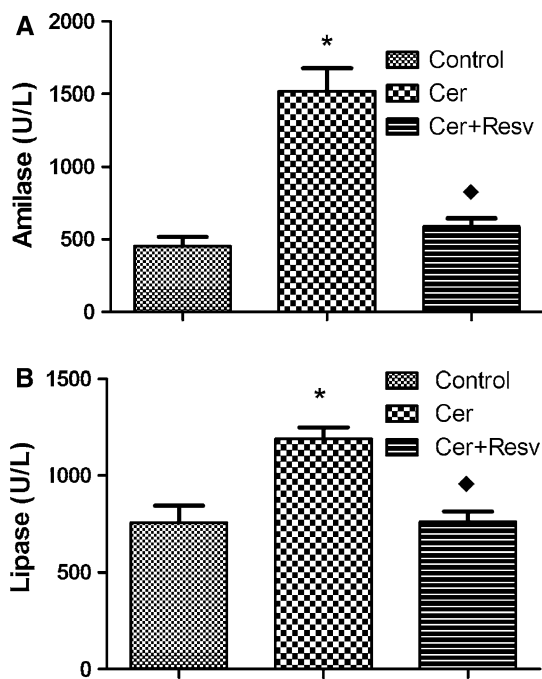


Fig. 2 Serum amylase and lipase levels. Rats were injected subcutaneously with four injections of cerulein (Cer) (20 mg kg^{-1} body weight) or vehicle (saline solution) at 2-h intervals, and resveratrol (Resv) (10 mg kg^{-1} body weight) was administered intraperitoneally 30 min before each cerulein injection, as indicated in the “Materials and methods” section. Data are represented as mean \pm SEM of six to eight separate experiments carried out in triplicate. * $P < 0.05$ statistically significant versus control group. ♦ $P < 0.05$ statistically significant versus pancreatitis group

compared to control group; once more, resveratrol-pretreated group suffered a statistically significant increase ($P < 0.05$) in the activity of this antioxidant enzyme, compared to resveratrol nontreated rats (Fig. 5b). Ultimately, SOD activity in pancreatitis and resveratrol-pretreated groups was significantly higher ($P < 0.05$), compared to control group. Nevertheless, a comparison between groups showed significant differences ($P < 0.05$), being this rise most marked in resveratrol-pretreated group (Fig. 5c).

Evidence consistently suggests that the earliest changes of acute pancreatitis are intracellular, the hallmark of which is premature intracellular activation of digestive zymogens, accompanied by disruption of intracellular calcium homeostasis and secretion in pancreatic acinar cells [27, 28]. Therefore, we wanted to study whether resveratrol was able to reverse the adverse effects of cerulein-induced pancreatitis on intracellular calcium signal. In the presence of extracellular calcium (calcium-normal medium), Fura-2-loaded rat pancreatic acinar cells were treated with the intracellular calcium-mobilizing agonist cholecystinin-octapeptide (CCK-8) (10 nM). As shown in Fig. 6a, treatment with CCK-8 induced a typical transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ due to

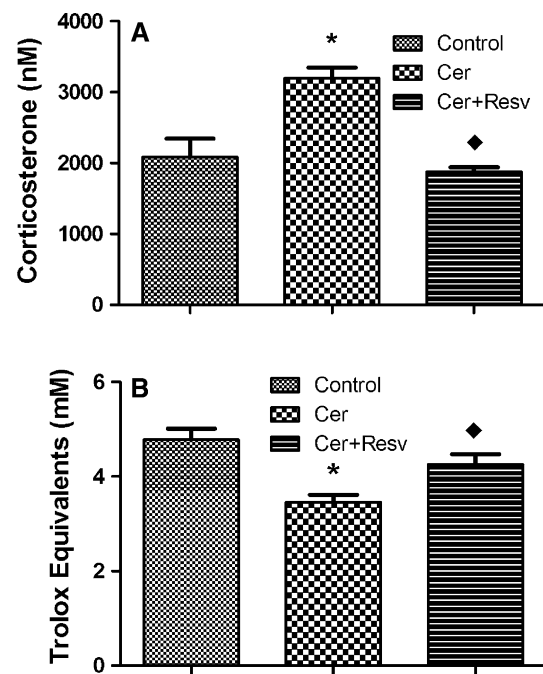


Fig. 3 Serum corticosterone and TAS levels. Rats were injected subcutaneously with four injections of cerulein (Cer) (20 mg kg^{-1} body weight) or vehicle (saline solution) at 2-h intervals, and resveratrol (Resv) (10 mg kg^{-1} body weight) was administered intraperitoneally 30 min before each cerulein injection, as indicated in the “Materials and methods” section. Data are represented as mean \pm SEM of six to eight separate experiments carried out in triplicate. * $P < 0.05$ statistically significant versus control group. ♦ $P < 0.05$ statistically significant versus pancreatitis group

calcium release from internal stores in untreated (control) pancreatic acinar cells. However, when CCK-8 was administered to acinar cells from cerulein-induced pancreatitis rats, calcium signal was much smaller compared to calcium signal obtained in acinar cells from untreated (control) rats (Fig. 6a). The integral of the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ above basal for 2.5 min after addition of CCK-8 taking data every second were $13,575 \pm 1,195$ and $3,785 \pm 762 \text{ nM s}$ in untreated (control) and cerulein-treated cells, respectively (Fig. 6b). However, pretreatment with resveratrol in cerulein-induced pancreatitis rats was able to reverse, at least partially, the calcium signal induced by treatment with cerulein (Fig. 6a). The integral of the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ above basal for 2.5 min after addition of CCK-8 was $10,492 \pm 1,095 \text{ nM s}$ in resveratrol-pretreated cells (Fig. 6b).

Discussion

In the past few years, a greater understanding of acute pancreatitis has led to improvement in mortality rates. Nevertheless, this disease continues to be a health care system problem due to its economical costs, in terms of

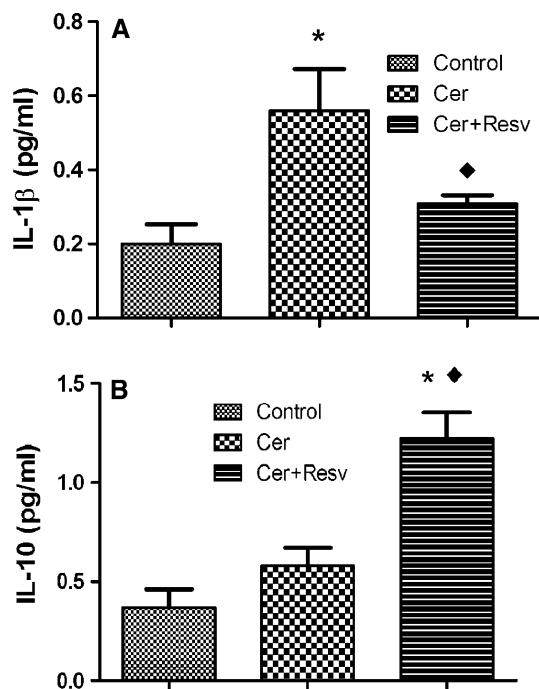


Fig. 4 Serum cytokines levels, including interleukin-1 β and interleukin-10. Rats were injected subcutaneously with four injections of cerulein (Cer) (20 mg kg^{-1} body weight) or vehicle (saline solution) at 2-h intervals, and resveratrol (Resv) (10 mg kg^{-1} body weight) was administered intraperitoneally 30 min before each cerulein injection, as indicated in the “Materials and methods” section. Data are represented as mean \pm SEM of six to eight separate experiments carried out in triplicate. * $P < 0.05$ statistically significant versus control group. ♦ $P < 0.05$ statistically significant versus pancreatitis group

intensive care, antibiotic administration and surgical interventions [29]. Consequently, future strategies such as antioxidant supplementation could be very promising, reducing the progression of the disease and patient’s recovery time, hence, long-term hospitalizations. In this sense, our results have shown that resveratrol has both antioxidant and immunoregulatory effects in the cerulein-induced acute pancreatitis experimental model.

Histopathological results showed that administration of cerulein caused acinar cell degeneration, edema and leukocyte infiltration; nevertheless, rats treated with resveratrol did not experience this loss in the tisular integrity, preserving its pancreatic architecture similar to control group. This protective effect has also been observed in previous studies [30–32].

Hyperamylasemia and hyperlipidemia, detected in this and other reports of experimental acute pancreatitis [6, 14], are typical manifestations of the early stages of the disease. In fact, these markers are commonly used for diagnosis in humans [33, 34]. Our results showed the role of resveratrol on premature activation of pancreatic enzymes, also observed in previous studies [30, 35].

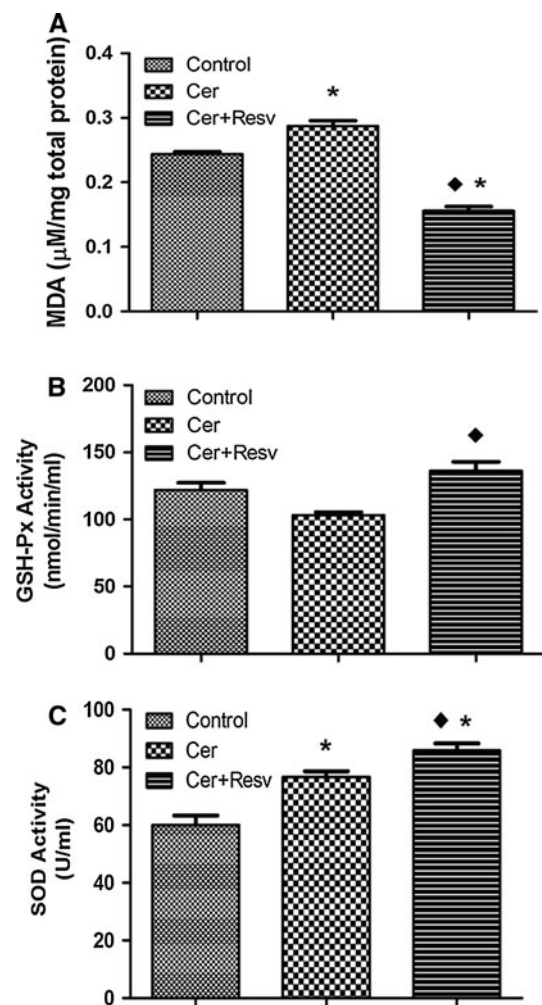


Fig. 5 Lipid peroxidation, GSH-Px, and SOD levels in pancreatic tissue. Rats were injected subcutaneously with four injections of cerulein (Cer) (20 mg kg^{-1} body weight) or vehicle (saline solution) at 2-h intervals, and resveratrol (Resv) (10 mg kg^{-1} body weight) was administered intraperitoneally 30 min before each cerulein injection, as indicated in the “Materials and methods” section. Data are represented as mean \pm SEM of six to eight separate experiments carried out in triplicate. * $P < 0.05$ statistically significant versus control group. ♦ $P < 0.05$ statistically significant versus pancreatitis group

On the other hand, nowadays, there is a lot of evidence concerning the implication of free radicals in several inflammatory diseases, such as acute pancreatitis [36]. As Ozkan et al. [14] pointed out oxidative stress is the pivotal effector of acinar cell injury in experimental acute pancreatitis, independently of the initiating agent or its route of attack. Furthermore, it seems that ROS are involved in the generation of pain in patients suffering the illness [11]. Our results showed that cerulein caused negative alterations in normal levels of different antioxidant markers. In a previous study, we demonstrated that levels of both corticosterone and TAS in serum were altered by the induction of acute pancreatitis in rats; nevertheless, exogenous

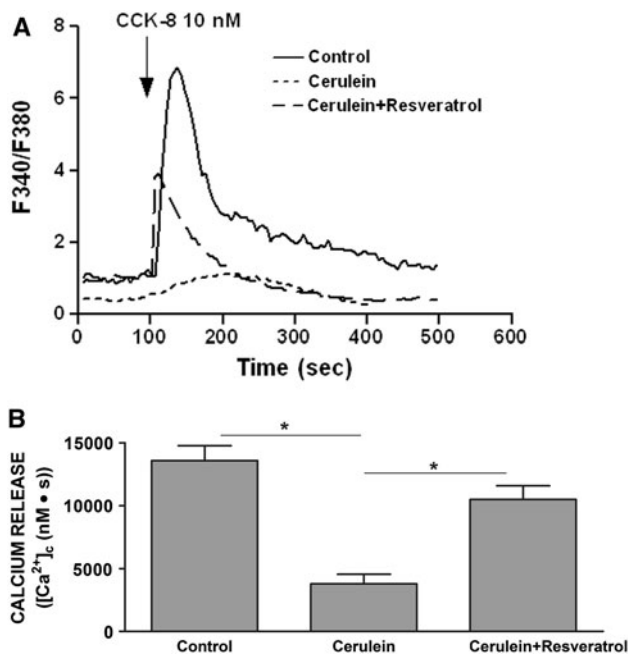


Fig. 6 Mobilization of cytosolic calcium in response to CCK-8 in rat pancreatic acinar cells. **a** Fura-2-loaded pancreatic acinar cells from untreated (control), cerulein-treated or cerulein plus resveratrol-pretreated rats were stimulated with 10 nM CCK-8 in calcium-normal solution (1.2 mM CaCl_2). Traces are representative of four independent experiments. **b** Histogram represents the integral for 2.5 min of the calcium release, in untreated (control), cerulein-treated, or cerulein plus resveratrol-treated rats, calculated as described in “Materials and methods” section. Values are mean \pm SEM of four independent experiments. * $P < 0.05$

administration of melatonin returned these parameters to control levels [18]. Likewise, resveratrol was also able to counteract the effect of cerulein in relation with these serum biomarkers, as well as pancreatic antioxidant enzymes. In this way, in accordance with our results and those obtained by other authors [30], resveratrol restored GSH-Px normal levels and minimized lipid peroxidation phenomenon in pancreas, also observed with melatonin [30], lycopene [14] or quercetin [37] supplementation therapies. It is established that lipid peroxidation causes damage in lipid membranes, including those of zymogen granules [9]. Nevertheless, opposite to observed in these studies, our results showed that both cerulein and resveratrol administration increased SOD levels, being this rise most marked in the resveratrol-pretreated group. Therefore, more studies are needed to determine which molecular mechanisms are activated as a function of the antioxidant administered.

Regarding to immune response, several inflammatory mediators are known to be not only starters of acute pancreatitis but also key factors in the development of necrosis [38]. For the first time, we report that resveratrol pretreatment upregulated the expression of IL-10. This

cytokine is considered to have an anti-inflammatory character, due to its influence on pro-inflammatory cytokines synthesis. In fact, this study showed that pro-inflammatory cytokine IL-1 β production was depressed by the administration of the phytoalexin. Similar results have been obtained in previous investigations of experimental acute pancreatitis [39, 40], and many in vitro [17, 41, 42] studies. In the past few years, it has been proven that resveratrol is able to inhibit the activation of the NF- κ B [40] and AP-1 [18], crucial transcription factors in the expression of pro-inflammatory cytokines genes. Additionally, this blockade of NF- κ B by resveratrol may be responsible of the suppression of lymphocyte proliferation and cell-mediated cytotoxicity, as pointed out by Gao et al. [17]. Finally, antioxidants such as resveratrol have the ability to reduce the degree of leukocyte infiltration to injured tissue, interfering with myeloperoxidase enzymatic activity [30]. From our point of view, the immunomodulatory properties showed by resveratrol, as well as other antioxidants, could be more helpful in the management of the disease than manipulating cytokine network or suppressing the inflammatory response. As Pezzilli et al. [43] alert, in the future we must be aware of several autoimmune phenomena in patients treated with cytokines and anti-cytokines therapies.

Finally, many of the etiological factors responsible for triggering acute pancreatitis have been identified but the pathophysiological mechanism by which they do so is still poorly understood. Free calcium ions within the cytosol of the acinar cells act as a key intracellular second messenger in the processes of stimulus-secretion coupling and may be crucial in the pathogenesis of acute pancreatitis. $[\text{Ca}^{2+}]_c$ signals have been shown to be disrupted early in experimental pancreatitis [28]. In fact, a disturbance of intracellular calcium signaling appears to be the common factor linking all the known triggers for acute pancreatitis and initiating the further sequence of pathological events leading to clinical disease [27]. In this respect, our results have shown that CCK-8-induced calcium release in pancreatic cells from cerulein-induced pancreatitis rats pretreated with resveratrol was similar to that obtained in pancreatic cells from untreated (control) rats. The reduced responsiveness to CCK-8 we found in pancreatic cells from cerulein-induced pancreatitis rats can be mainly due to an abnormal calcium signaling. Our results are in agreement with previous reports which suggest that pancreatitis can disrupt cellular calcium homeostasis in pancreatic acinar cells [27, 28].

Nowadays, the main problem in the treatment of acute pancreatitis in humans is the poor homogeneity in clinical practice. In this sense, there are many differences between medical centers, from correct clinical classification to strategies employed to every patient. Experts agree in the

importance of an early treatment, no longer than 60 h from the onset of the symptoms, to obtain good therapeutic results [31]. Recently, antioxidants are being considered as promising candidates for the treatment of acute pancreatitis, due to its ability to counteract many different aspects of this multidimensional illness. These molecules, such as resveratrol, could not only act as direct scavengers of free radicals but also as immunoregulators, promoters of antioxidant enzyme system, enhancers of microcirculation [44], regulators of intracellular calcium and stabilizers of lipid membranes [45]. In the future, as other authors mark [4, 11, 31, 43], an early administration of antioxidant cocktails, alone or combined with some successful strategies (enteral feeding and/or probiotics), could further reduce mortality rates, avoiding necrotic evolution and subsequent infections. It would be advisable to design antioxidants molecules able to accumulate preferentially in mitochondria, main intracellular source of ROS [46]. On the other hand, it is recommendable not to forget the protective effect of endogenous melatonin in the early course of human acute pancreatitis, as Belyaev et al. [47] advises.

In conclusion, this study confirms antioxidant and immunomodulatory properties of resveratrol as chemopreventive in cerulein-induced acute pancreatitis, which can be related to intracellular calcium signal. The non-toxic character of this phytoalexin at low dose [48] ensures its use in clinical practice. More studies are needed to determine if antioxidant treatment, alone or in combination with other strategies, is as useful in humans as in animal models of the disease.

Acknowledgments This work was supported by MICINN-FEDER (BFU2010-15049) and Gobierno de Extremadura (Re: GRU10003) grants. The authors thank technical and human support provided by Facility of Bioscience Applied Techniques of SAIUEx (financed by UEX, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER and FSE), and Ms. Ana M. Marchena and Ms. Lourdes Franco for their excellent technical assistance. C. Carrasco holds a research from Plan de Captación y Formación de Recursos Humanos en Investigación de la UEx (No. 1076).

Conflict of interest The authors have declared that there is no conflict of interest.

References

1. Wu XN (2000) Current concept of pathogenesis of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 6:32–36
2. Navarro S, Amador J, Argüello L, Ayuso C, Boadas J, de las Heras G, Farré A, Fernández-Cruz L, Ginés A, Guarnier L, López A, Llach J, Lluis F, Madaria E, Martínez J, Mato R, Molero X, Oms L, Pérez-Mateo M, Vaquero E (2008) Recomendaciones del Club Español Biliopancreático para el Tratamiento de la Pancreatitis Aguda. Conferencia de Consenso. *Gastroenterol Hepatol* 31:366–387
3. Büchler MW, Gloor B, Müller CA, Friess H, Seiler CA, Uhl W (2000) Acute necrotizing pancreatitis: treatment strategy according to the status of infection. *Ann Surg* 232:619–626
4. Chen C, Xia SH, Chen H, Li XH (2008) Therapy for acute pancreatitis with platelet-activating factor receptor antagonists. *World J Gastroenterol* 14:4735–4738
5. Johnson CD, Kingsnorth AN, Imrie CW, McMahon MJ, Neoptolemos JP, McKay C, Toh SK, Skaife P, Leeder PC, Wilson P, Larvin M, Curtis LD (2001) Double blind, randomized, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis. *Gut* 48:62–69
6. Çöl C, Dinler K, Hasdemir O, Buyukasik O, Bugdayci G (2010) Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 9:78–82
7. Wisner J, Green D, Ferrell L, Renner I (1988) Evidence for a role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of caerulein induced acute pancreatitis in rats. *Gut* 29:1516–1523
8. Jung KH, Hong SW, Zheng HM, Lee HS, Lee H, Lee DH, Lee SY, Hong SS (2010) Melatonin ameliorates caerulein-induced pancreatitis by modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB in rats. *J Pineal Res* 48:239–250
9. Niederau C, Klonowski H, Schulz HU, Sarbia M, Lüthen R, Häussinger D (1996) Oxidative injury to isolated rat pancreatic acinar cells vs. isolated zymogen granules. *Free Radic Biol Med* 20:877–886
10. Norman J (1998) The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 175:76–83
11. Esrefoğlu M (2012) Experimental and clinical evidence of antioxidant therapy in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 18:5533–5541
12. Esrefoğlu M, Gül M, Ates B, Batçioğlu K, Selimoğlu MA (2006) Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 12:259–264
13. Jaworek J, Szklarczyk J, Jaworek AK, Nawrot-Porąbka K, Leja-Szpak A, Bonior J, Kot M (2012) Protective effect of melatonin on acute pancreatitis. *Int J Inflamm* 2012. doi:10.1155/2012/173675
14. Ozkan E, Akyüz C, Dulundu E, Topaloğlu U, Sehirli AÖ, Ercan F, Sener G (2012) Protective effects of lycopene on cerulein-induced experimental acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* 176:232–238
15. Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X (2003) Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 30:1017–1026
16. Fremont L (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66:663–673
17. Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC (2001) Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol* 62:1299–1308
18. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB (2000) Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 15:6509–6519
19. Siemann EH, Creasy LL (1992) Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic* 43:49–52
20. Carrasco C, Marchena AM, Holguín-Arévalo MS, Martín-Partido G, Rodríguez AB, Pariente JA (2012) Anti-inflammatory effects of melatonin in a rat model of caerulein-induced acute pancreatitis. *Cell Biochem Funct* 31:585–590

21. Granados MP, Salido GM, Pariente JA, González A (2004) Generation of ROS in response to CCK-8 stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *Mitochondrion* 3:285–296
22. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
23. Gonzalez A, Schmid A, Salido GM, Camello PJ, Pariente JA (2002) XOD-catalyzed ROS generation mobilizes calcium from intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* 14:153–159
24. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
25. Espino J, Bejarano I, Redondo PC, Rosado JA, Barriga C, Reiter RJ, Rodríguez AB, Pariente JA (2010) Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signalling in human leukocytes: evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. *J Membr Biol* 233:105–118
26. Heemskerk JW, Feijge MA, Henneman L, Rosing J, Hemker HC (1997) The Ca^{2+} -mobilizing potency of alpha-thrombin and thrombin-receptor-activating peptide on human platelets-concentration and time effects of thrombin-induced Ca^{2+} signalling. *Eur J Biochem* 249:547–555
27. Sutton R, Criddle D, Raraty MG, Tepikin A, Neoptolemos JP, Petersen OH (2003) Signal transduction, calcium and acute pancreatitis. *Pancreatol* 3:497–505
28. Petersen OH (2009) Ca^{2+} signalling in pancreatic acinar cells: physiology and pathophysiology. *Braz J Med Biol Res* 42:9–16
29. Neoptolemos JP, Raraty M, Fichn M, Sutton R (1998) Acute pancreatitis: the substantial human and financial costs. *Gut* 42:886–891
30. Li ZD, Ma QY, Wang CA (2006) Effect of resveratrol on pancreatic oxygen free radicals in rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 12:137–140
31. Fantini L, Tomassetti P, Pezzilli R (2006) Management of acute pancreatitis: current knowledge and future perspectives. *World J Emerg Surg* 23:1–16
32. Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay BD, Ozturk H, Buyukbayram H (2008) Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 14:7101–7106
33. Matull WR, Pereira SP, O'Donohue JW (2006) Biochemical markers of acute pancreatitis. *J Clin Pathol* 59:340–344
34. Çöl C, Dinler K, Hasdemir AO, Bugdayci G (2009) The effect of an intraperitoneal injection of melatonin on serum amylase levels in acute pancreatitis. *JOP* 10:306–309
35. Szabolcs A, Varga IS, Varga C, Berkó A, Kaszaki J, Letoha T, Tiszlavicz L, Sári R, Lonovics J, Takács T (2006) Beneficial effect of resveratrol on cholecystokinin-induced experimental pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 532:187–193
36. Leung P, Chan Y (2009) Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxid Redox Signal* 11:135–166
37. Carvalho KM, Morais TC, de Melo TS, de Castro Brito GA, de Andrade GM, Rao VS, Santos FA (2010) The natural flavonoid quercetin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Biol Pharm Bull* 33:1534–1539
38. Zhang XP, Li ZJ, Zhang J (2009) Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 8:351–357
39. Ma ZH, Ma QY, Wang LC, Sha HC, Wu SL, Zhang M (2005) Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. *Inflamm Res* 54:522–527
40. Meng Y, Ma QY, Kou XP, Xu J (2005) Effect of resveratrol on activation of nuclear factor kappa-B and inflammatory factors in rat model of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 11: 525–528
41. Zhong M, Cheng GF, Wang WJ, Guo Y, Zhu XY, Zhang JT (1999) Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. *Phytomedicine* 6:79–84
42. Culpitt SV, Rogers DF, Fenwick PS, Shah P, De Matos C, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE (2003) Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax* 58:942–946
43. Pezzilli R, Ceciliato R, Barakat B, Corinaldesi R (2004) Immunemanipulation of the inflammatory response in acute pancreatitis. What can be expected? *JOP* 5:115–121
44. Meng Y, Zhang M, Xu J, Liu XM, Ma QY (2005) Effect of resveratrol on microcirculation disorder and lung injury following severe acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 11: 433–435
45. Ma Q, Zhang M, Wang Z, Ma Z, Sha H (2011) The beneficial effect of resveratrol on severe acute pancreatitis. *Ann N Y Acad Sci* 1215:96–102
46. Sheu SS, Nauduri D, Ander MW (2006) Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochem Biophys Acta* 1762:256–265
47. Belyaev O, Herzog T, Munding J, Bolik B, Vosschulte A, Uhl W, Müller CA (2011) Protective role of endogenous melatonin in the early course of human acute pancreatitis. *J Pineal Res* 50:71–77
48. Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS (2004) Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci* 82:614–619

5. DISCUSIÓN GENERAL

La pancreatitis aguda (PA) es una enfermedad de carácter inflamatorio que, si bien en la mayoría de los casos es autolimitante, puede provocar la muerte del paciente por fallo multiorgánico y/o sepsis. En los últimos años, un mayor conocimiento de la dolencia ha dado lugar a la disminución de las tasas de mortalidad. Sin embargo, esta enfermedad continúa siendo un problema para los sistemas sanitarios de todo el mundo, debido a su alto coste económico en términos de cuidados intensivos, administración antibiótica e intervención quirúrgica (Neoptolemos y cols., 1998). Consecuentemente, estrategias como la suplementación antioxidante han mostrado ser muy prometedoras, pudiendo llegar a reducir la progresión de la enfermedad y el tiempo de recuperación del paciente, o lo que es lo mismo, las hospitalizaciones de larga duración. A pesar de los esfuerzos realizados en investigación, aún no se han conseguido dilucidar completamente los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la PA y los expertos se debaten aún entre cuál de las hipótesis planteadas, autodigestiva u oxidativa, representa mejor la realidad en humanos. En base a las evidencias científicas obtenidas en la presente Tesis Doctoral, es muy probable que ambas hipótesis se encuentren interrelacionadas y formen una red de extrema complejidad. En el futuro, dicha red necesitará ser comprendida en su totalidad para poder identificar potenciales dianas terapéuticas que permitan el desarrollo y posterior aplicación de tratamientos limitantes de las complicaciones sistémicas, últimas responsables de las altas tasas de mortalidad de esta enfermedad.

Numerosos estudios han demostrado que la melatonina es una molécula que ofrece grandes posibilidades en relación al tratamiento de distintas enfermedades, gracias a sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias e inmunorreguladoras. De ahí que sea una candidata ideal para el tratamiento de la PA, evitando el desarrollo de posteriores complicaciones como necrosis, sepsis y fallo multiorgánico. El modelo experimental de PA inducida por ceruleína continúa siendo muy recomendable para el estudio de los mecanismos celulares implicados en las primeras fases de la enfermedad tales como el estrés oxidativo, con una alta reproducibilidad y fiabilidad en los resultados obtenidos (Zhao y cols., 2013). Adicionalmente, se muestra como una herramienta eficaz en el testeo de nuevas terapias preventivas frente a la enfermedad.

Desde que Sanfey y cols. (1984) señalaran la implicación de ERO/ERN en la fisiopatología de la PA, multitud de ensayos realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, han confirmado la participación de estas moléculas altamente reactivas en el desarrollo de la enfermedad. Como señalan Özkan y cols. (2012) el estrés oxidativo sería el efector principal del daño en las células acinares en la PA experimental, independientemente del agente iniciador o la ruta de ataque. Además, las ERO/ERN parecen ser las responsables de la generación de dolor

en pacientes con esta enfermedad (Eşrefoğlu y cols., 2006). A pesar de este descubrimiento, aún no se ha conseguido determinar si los radicales libres funcionan como iniciadores o amplificadores del evento inflamatorio (Closa, 2013). De cualquier modo, la exposición a estrés oxidativo produce peroxidación lipídica, daño proteico (Reinheckel y cols., 1998), permeabilidad microvascular incrementada (Del Maestro y cols., 1982) y una alta susceptibilidad al daño oxidativo en gránulos de zimógeno aislados (Niederau y cols., 1996), entre otros fenómenos. De hecho, transcurridos 10 minutos desde la exposición a estrés oxidativo, ya son detectables cambios morfológicos subcelulares como la colocalización de vacuolas y gránulos de zimógeno en las células lumbinales, fenómeno sospechoso de ser responsable de la activación prematura de la tripsina (Niederau y cols., 1996). Por tanto, es posible que la exposición a un estado de estrés oxidativo exacerbado predisponga a la enfermedad a aquellos individuos con diversos factores de riesgo (Braganza, 2000). Probablemente, en esta situación patológica, la incapacidad de las defensas endógenas y/o la insuficiencia de antioxidantes dietéticos colaboradoras de las mismas, desembocan en la destrucción glandular por causa tanto de la activación incontrolada de enzimas pancreáticas como de la infiltración leucocitaria.

En el modelo experimental de la PA inducida por ceruleína, las primeras evidencias de daño pancreático comienzan a detectarse a los 15 minutos del inicio de la administración del análogo de CCK, alcanzando su punto máximo a las 12 horas y resolviéndose espontáneamente a las 24-48 horas (Mayerle y cols., 2013). De este modo, y en concordancia con lo descrito por otros autores (Ding y cols., 2003; Eşrefoğlu y cols., 2006), los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral muestran que las alteraciones estructurales a nivel tisular aparecen progresivamente y de forma dosis-dependiente a lo largo de las primeras horas de experimentación. Esta transformación de la arquitectura pancreática viene acompañada de infiltración de células inmunitarias, como leucocitos polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos, que por quimioatracción acuden a la zona dañada y comienzan a sintetizar citocinas, radicales libres y otros mediadores inflamatorios que podrían dar lugar a la destrucción de la glándula. Sin embargo, la administración exógena de melatonina previene tanto la disgregación tisular como la infiltración leucocitaria, como ya había sido observado previamente por otros autores (Barlas y cols., 2004; Jaworek y cols., 2003). A este nivel estructural, entre los mecanismos pancreatoprotectores de la melatonina probablemente se encuentren la interferencia indirecta con fenómenos de lipoperoxidación en células endoteliales y pancreáticas, y la capacidad de incrementar el flujo sanguíneo. De esta forma, se conseguiría minimizar los efectos provocados por la administración de ceruleína, como el incremento en la permeabilidad microvascular y la aparición de edema (Jaworek y cols., 2003; Jaworek y cols., 2004; Çöl y cols., 2010). Adicionalmente, los resultados ponen de manifiesto la concurrencia de hiperamilasemia e hiperlipidemia, sumándose a los fenómenos tempranos presentes en el curso de la PA inducida por ceruleína, como se ha registrado en otros estudios *in vivo* de PA (Uruñuela y cols., 2002; Alhan y cols., 2004; Çöl y cols., 2009). Estas alteraciones bioquímicas son usadas comúnmente

en el diagnóstico clínico de la PA en humanos (Matull y cols., 2006; Çöl y cols., 2009). Al analizar los resultados obtenidos se observó que el tratamiento preventivo con melatonina consiguió contrarrestar la elevación sérica de ambos marcadores. Por tanto, la administración del indol reduce la activación y liberación incontrolada de enzimas pancreáticas al torrente sanguíneo. Aunque estos efectos ya han sido mostrados en otros estudios (Jaworek y cols., 2003; Eşrefoğlu y cols., 2006; Çöl y cols., 2009), los resultados no son concluyentes y existen algunas evidencias que señalan el efecto contrario, al menos, en el caso de la amilasa (Qi y cols., 1999; Barlas y cols., 2004). La disminución de la liberación y activación de lipasa pancreática ayudaría a prevenir la necrosis grasa peripancreática, limitando el progreso de la enfermedad (Steinberg y cols., 1994).

En relación a la función antioxidante de la melatonina, parece ejercerse a distintos niveles y en distintas localizaciones, gracias a su ya mencionada característica anfipática. En la presente Tesis Doctoral se ha registrado por primera vez que los fenómenos anteriormente mencionados se traducen en alteraciones detectables de determinados biomarcadores séricos y tisulares de estrés oxidativo, como la corticosterona y el estado antioxidante total. En este sentido, el tratamiento preventivo con melatonina de la PA revierte los niveles de ambos marcadores hasta niveles próximos a los del grupo control. La recuperación del estado antioxidante total, tanto sérico como tisular, debido a la suplementación con melatonina podría deberse a la estimulación de la síntesis y reciclaje de GSH, uno de los mayores antioxidantes extracelulares, y/o a la represión de enzimas pro-oxidantes como la NOS (Bonfont-Rousselot y cols., 2010). Del mismo modo, al analizar las determinaciones tisulares, se observa que los niveles de lipoperoxidación (en términos de MDA), así como los de proteínas modificadas (grupos carbonilo), se ven incrementados en las ratas pancreáticas, al contrario de lo que sucede en las ratas pretratadas con melatonina. Por tanto, los resultados obtenidos muestran el efecto protector de la administración exógena del indol sobre los diversos fenómenos estructurales que provocan daño en la glándula. Muchos otros estudios han observado la capacidad de la melatonina para contrarrestar la lipoperoxidación en tejido pancreático (Jaworek y cols., 2003; Çöl y cols., 2010; Jaworek y cols., 2010; Jung y cols., 2010), al igual que otras moléculas antioxidantes (Szabolcs y cols., 2006; Carvalho y cols., 2010; Lima y cols., 2013; Zhang y cols., 2013). Cabe reseñar que, debido a su estructura química, la melatonina no podría actuar directamente sobre los peróxidos lipídicos (Antunes y cols., 1999), pero sí como *scavenger* de radicales $\cdot\text{OH}$ implicados en el fenómeno de lipoperoxidación. De cualquier forma, este tratamiento antioxidante no sólo protegería a los ácidos grasos de la membrana de las células acinares, sino también la integridad de los gránulos de zimógeno y otras estructuras lipídicas intracelulares. Como resultado, la toxicidad inducida por peroxidación lipídica, como el incremento de la fluidez membranal, el flujo de salida citosólico, la pérdida de la actividad de las proteínas de membrana e incluso la muerte celular, podría ser reducida. Asimismo, este hecho tendría una gran importancia en la gestión de la respuesta inflamatoria, teniendo en

cuenta que los ácidos grasos de las membranas celulares son precursores de mediadores inflamatorios (por ejemplo, prostaglandinas) (Kuliavienė y cols., 2013). La lipoperoxidación en la capa endotelial de los capilares y vénulas podría ser igualmente contrarrestada y, así, los fenómenos de incremento de permeabilidad y edema (Qi y cols., 1999). Paralelamente, la ya mencionada disfunción de las proteínas membranales consecuencia de la lipoperoxidación, es agravada por el ataque directo de ERO sobre las mismas, dando lugar a la aparición de grupos carbonilos, entre otras modificaciones proteicas. En la presente Tesis Doctoral el pretratamiento con melatonina disminuye los niveles tisulares elevados de grupos carbonilos en la PA inducida por ceruleína, efecto igualmente observado en diferentes modelos animales (Sener y cols., 2003; Atilgan y cols., 2012). Por tanto, la oxidación proteica podría sumarse a los eventos oxidativos tempranos a evitar por la quimioprevención con antioxidantes. Analizados en conjunto, estos resultados corroborarían las propiedades antioxidantes de la hormona pineal *per se* actuando, entre otros modos, como *scavenger* directo de radicales libres y estabilizadora de la principal fuente celular de ERO, la mitocondria. Esta última vía de actuación sería de vital importancia en la regulación de las señales de apoptosis/necrosis, que afectarían de diferentes maneras al progreso de la enfermedad.

Adicionalmente, la melatonina también podría ejercer un efecto antioxidante indirecto sobre la PA a través de la estimulación del sistema antioxidante enzimático endógeno. Éste resulta afectado negativamente en el desarrollo de la enfermedad y es muy probable que esta situación de desequilibrio oxidación/antioxidación termine agravando la progresión de la misma. Se ha observado que concentraciones fisiológicas de melatonina influyen en la capacidad antioxidante del suero humano (Benot y cols., 1999). Asimismo, las enzimas antioxidantes exhiben un ritmo endógeno bajo condiciones normales de luz/oscuridad (Rodríguez y cols., 2004; Pandi-Perumal y cols., 2008). En el contexto patológico de la PA, se ha descrito que la administración del indol durante la misma aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx (Eşrefoğlu y cols., 2006; Çöl y cols., 2010; Jaworek y cols., 2012). De acuerdo con los resultados de otros autores (Jaworek y cols., 2010; Jung y cols., 2010), los resultados de esta Tesis muestran que los niveles tisulares de GPx disminuyen durante la PA, al igual que sucede con el estado antioxidante total. Todo parece indicar que las ratas pancreatíticas tienen una capacidad antioxidante comprometida, comparado con el resto de grupos experimentales. No obstante, la administración exógena de melatonina es capaz de revertir la concentración de estos marcadores en ratas pretratadas con melatonina a niveles cercanos a los del grupo control. Está documentado que la melatonina regula la expresión de las defensas antioxidantes (Rodríguez y cols., 2004) a través de la influencia sobre la función de factores de transcripción tan importantes como NF- κ B (Jung y cols., 2010). Como señalan Franco y cols. (1999), parece que la respuesta de los genes que codifican para enzimas antioxidantes al estrés oxidativo difiere en función del tejido. El equilibrio entre los factores reguladores positivos y negativos podría determinar diferentes patrones de inducción génica, según el estímulo oxidativo y el

tejido. Además, la estimulación *in vitro* de los genes de enzimas antioxidantes ocurre en el medio de cultivo a concentraciones nanomolares de melatonina, muy lejos de las dosis suprafisiológicas administradas a las ratas en los modelos experimentales de PA (Rodríguez y cols., 2004). Por tanto, aún se desconoce si el efecto antioxidante de la melatonina en PA estaría más relacionado con sus habilidades *scavenger*, o con la estimulación directa de la expresión de la defensa antioxidante. De cualquier modo, la administración exógena de melatonina podría reducir el estado de estrés oxidativo local hasta niveles inductores de la expresión de genes antioxidantes (Rodríguez y cols., 2004).

Desde el punto de vista de la respuesta inflamatoria, una vez que las células inmunitarias acuden a la zona dañada, su actividad podría promover la producción de radicales libres peligrosos. Paralelamente, éstas sintetizarían citocinas proinflamatorias que atraerían más células inmunitarias activadas al páncreas, empeorándose el estado inflamatorio del órgano. Se sospecha que la interacción entre el sistema inmunitario y la melatonina es bidireccional, actuando el indol como enlace funcional entre los sistemas neuroendocrino e inmunohematopoyético (Claustrat y cols., 2005; Handerland y cols., 2008). Esta Tesis Doctoral viene a confirmar la función inmunorreguladora de la melatonina en la PA. En algunas especies animales, como ratas y tórtolas, se conoce que la administración exógena de melatonina modula el equilibrio entre citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (Delgado y cols., 2012). En relación a la PA, la respuesta del sistema inmunitario parece ser idéntica independientemente de la causa que la origine, distinguiéndose sólo por el grado de intensidad en el que se manifiesta (Sanfey y cols., 1984). El hecho de que el equilibrio existente entre citocinas pro- y anti-inflamatorias desaparezca parece ser un factor crucial en el desarrollo de la enfermedad (Wu, 2000). El análisis realizado en esta Tesis Doctoral corrobora los resultados obtenidos por otros autores en relación a la elevación de los niveles séricos de IL-1 β y TNF- α durante el curso de la PA, tanto en animales de experimentación (Jaworek y cols., 2002) como en humanos (Exley y cols., 1992; Pezzilli y cols., 1999). En general, la implicación de estas citocinas pro-inflamatorias sintetizadas por las células inmunitarias atraídas a la zona en las etapas tempranas de la PA es aceptada. Adicionalmente, se especula con que su participación durante las etapas posteriores de la dolencia contribuya a la diseminación sistémica de la inflamación a otros órganos (Rau y cols., 2000). Los resultados de la presente Tesis Doctoral muestran que, además de reducir la concentración de citocinas pro-inflamatorias, el tratamiento previo con melatonina incrementa los niveles de citocinas anti-inflamatorias como la IL-4, en consonancia con lo observado en otros estudios (Jaworek y cols., 2003). La habilidad del indol para llevar a cabo esta inmunorregulación probablemente se deba a la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa\beta$ (Chuang y cols., 1996; Jung y cols., 2010), el cual controla la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria (producción de prostaglandinas, citocinas, moléculas de adhesión celular y óxido nítrico) (Jung y cols., 2010). Sin embargo, en un estudio

realizado *in vitro* sobre la producción de citocinas en células acinares se observó que dicho mecanismo no resultaba alterado en las 3 horas siguientes a la inducción de la PA. Consecuentemente, aún no se ha determinado si la melatonina podría ejercer su influencia sobre el sistema inmune a través de diversas vías de actuación.

En relación al tratamiento quimiopreventivo con resveratrol, los resultados de la presente Tesis Doctoral mostraron que, al igual que la melatonina, el estilbeno presenta tanto efectos antioxidantes como inmunorreguladores en el modelo experimental de PA inducida por ceruleína. Mientras que los resultados histopatológicos revelan que la administración de ceruleína causa degeneración acinar, edema e infiltración leucocitaria en las ratas con pancreatitis, las ratas tratadas previamente con resveratrol no experimentan dicha pérdida de integridad tisular, preservando su arquitectura pancreática similar a la del grupo control. Este efecto protector ha sido también observado en estudios anteriores (Fantini y cols., 2006; Li y cols., 2006; Gedik y cols., 2008). Asimismo, la hiperamilasemia e hiperlipidemia detectadas en la investigación conducente a esta Tesis son revertidas por el tratamiento quimiopreventivo con resveratrol, al igual que en otros estudios experimentales de PA (Çöl y cols., 2010; Özkan y cols., 2012). Así, quedaría confirmado el rol del resveratrol en la activación prematura de las enzimas pancreáticas, como señalan algunos autores (Li y cols., 2006; Szabolcs y cols., 2006). Aunque las inyecciones de ceruleína causan alteraciones negativas en los niveles normales de diferentes marcadores antioxidantes en suero (corticosterona y estado antioxidante total), la administración exógena de resveratrol es capaz de contrarrestar el efecto del análogo de CCK sobre dichos parámetros. Además, a nivel tisular, la administración exógena de resveratrol minimiza el fenómeno de lipoperoxidación en el páncreas. Este mismo efecto sobre la PA experimental ha sido registrado con terapias de suplementación antioxidante de licopeno (Özkan y cols., 2012) y quercetina (Carvalho y cols., 2010). Cabe destacar que el resveratrol, además de neutralizar radicales OH^\bullet , se comporta como un antioxidante terminador de cadena secuestrando radicales LOO^\bullet y finalizando las reacciones en cadena típicas de la lipoperoxidación. Por tanto, la habilidad *scavenger* del estilbeno podría actuar a distintos niveles para disminuir el estado oxidativo exacerbado típico de la PA experimental.

En cuanto a la disminución de los niveles de enzimas antioxidantes pancreáticas causados por las inyecciones de ceruleína, según los resultados de esta Tesis y los obtenidos por otros autores (Li y cols., 2006), el pre-tratamiento con resveratrol restaura los niveles normales de GPx. Este mismo efecto sobre la PA experimental ha sido registrado con terapias de suplementación antioxidante de licopeno (Özkan y cols., 2012) y quercetina (Carvalho y cols., 2010). No obstante, al contrario de lo observado en estos estudios, los resultados muestran que tanto la administración de ceruleína como de resveratrol incrementan los niveles de SOD, siendo más marcado en el grupo pre-tratado con el fenol. Tal vez este aumento en la

concentración total de SOD se deba a la porción de Mn-SOD mitocondrial, como resultado del daño oxidativo de este orgánulo. Las diferentes formas SOD ejercen su función antioxidante de forma indirecta previniendo la liberación de iones de hierro desde los clusters hierro-sulfuro y, por tanto, evitando reacciones de Fenton y otros fenómenos mediados por iones metálicos, como la lipoperoxidación y la fragmentación de ADN (Kalyanaraman y cols., 2013). Por tanto, ante la disparidad de resultados, se vuelve a hacer patente la necesidad de realizar más estudios que determinen qué mecanismos moleculares son activados en función del antioxidante administrado.

Varios mediadores inflamatorios son conocidos no sólo por ser iniciadores de la PA, sino por ser claves en el desarrollo de necrosis (Zhang y cols., 2009). Los resultados señalan que el pre-tratamiento con resveratrol incrementa la expresión de IL-10, citocina considerada anti-inflamatoria por a su influencia sobre la síntesis de citocinas pro-inflamatorias; por el contrario, la producción de IL-1 β se ve disminuida. Resultados similares se han obtenido en investigaciones previas de PA experimental (Ma y cols., 2005; Meng y cols., 2005) y en diversos estudios realizados *in vitro* (Zhong y cols., 1999; Gao y cols., 2001; Culpitt y cols., 2003). Se ha observado que el resveratrol es capaz de inhibir la activación de NF- κ B (Meng y cols., 2005) y AP-1 (Manna y cols., 2000), factores de transcripción cruciales en la expresión de genes codificantes de enzimas pro-inflamatorias. El resveratrol exhibe propiedades inmunomoduladoras a través de la inhibición de distintas fases de la respuesta inflamatoria, desde el reclutamiento e inicial de polimorfonucleares para su activación, hasta la liberación de mediadores proinflamatorios (Cucciolla y cols., 2007). Asimismo, los antioxidantes como el estilbeno tienen la habilidad de reducir el grado de infiltración leucocitaria al tejido dañado, interfiriendo en la actividad enzimática MPO (Li y cols., 2006). El bloqueo ejercido por el resveratrol sobre NF- κ B podría ser responsable de la supresión de la proliferación linfocitaria y de la citotoxicidad mediada por células, como señala Gao y cols. (2001). En base a los resultados obtenidos en la presente Tesis, las propiedades inmunomoduladoras mostradas por el resveratrol, así como por otros antioxidantes, podrían ser de más ayuda en la gestión de la PA que otras terapias encaminadas a manipular la red de citocinas o a suprimir la respuesta inflamatoria. Como Pezzilli y cols. (1999) alertan, en el futuro se deberán tener en cuenta los distintos fenómenos autoinmunes que puedan surgir en pacientes tratados con terapias basadas en citocinas y anti-citocinas.

Finalmente, otro de los mecanismos fisiopatológicos responsables del desencadenamiento de la PA podría ser la alteración de la señal Ca²⁺ intracelular. En el citosol de las células acinares, los iones libres de Ca²⁺ actúan como mensajeros intracelulares claves en los procesos acoplados de estimulación-secreción, a través de la producción de ATP mitocondrial y el transporte vesicular. Se ha observado que las señales inducidas por concentraciones incrementadas de Ca²⁺ citosólico son interrumpidas tempranamente en la PA

experimental (Petersen, 2009), registrándose niveles altos y sostenidos en el tiempo, que podrían ser determinantes en la activación de los zimógenos pancreáticos (Sah y cols., 2012). De hecho, la alteración de la señal intracelular de Ca^{2+} parece ser un factor común en la PA, conectando todos los iniciadores conocidos y precipitando la secuencia posterior de eventos patológicos que dan lugar a la enfermedad (Sutton y cols., 2003). En este aspecto, los resultados de la presente Tesis Doctoral muestran que la inducción de la liberación de Ca^{2+} por CCK-8 en las células pancreáticas procedentes de las ratas pre-tratadas con resveratrol es similar a la obtenida en células pancreáticas de ratas no tratadas (control). Por el contrario, la respuesta a CCK-8 presente en los acinos pancreáticos de las ratas pancreáticas es menor, pudiendo deberse principalmente a la señalización anormal de Ca^{2+} . Estos resultados estarían de acuerdo con estudios previos que sugieren que la PA puede alterar la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en las células acinares pancreáticas (Sutton y cols., 2003; Petersen, 2009). Parece ser que altos niveles de ERO/ERN colaborarían en el mantenimiento de los niveles fisiopatológicos de Ca^{2+} en la PA, afectando así a la funcionalidad mitocondrial y, por tanto, a la síntesis de ATP, clave en la señalización de necrosis frente a la de apoptosis. Adicionalmente, el resveratrol podría contribuir a la biogénesis mitocondrial (Ungvari y cols., 2011). Por tanto, una vez más la actuación antioxidante a este nivel podría prevenir la evolución a formas necróticas de la enfermedad, disminuyendo las tasas de mortalidad en esta segunda fase.

Hoy en día, el principal problema en el tratamiento de la PA en humanos es la pobre homogeneidad en la práctica clínica. En este sentido, existen muchas diferencias entre los centros médicos, desde la correcta clasificación clínica hasta las estrategias empleadas para cada paciente. Los expertos coinciden en la importancia del tratamiento temprano, no superior a las 60h del comienzo de los síntomas, para la obtención de buenos resultados terapéuticos (Fantini y cols., 2006). Como señalan Fantini y cols. (2006), debido al carácter multidimensional de la pancreatitis aguda sería recomendable, en vez de buscar una única "droga mágica", utilizar cócteles terapéuticos que bloqueen los distintos pasos implicados en la fisiopatología de la enfermedad. De ahí que el paradigma "un medicamento, una diana" deba ser revisado (Cucciola y cols. 2007). Precisamente, la habilidad polivalente exhibida por diversos antioxidantes hace que la suplementación antioxidante haya comenzado a considerarse como una firme candidata en el tratamiento de la PA. Los compuestos antioxidantes presentes en la dieta sólo actuarían como *scavengers* directos, sino también como inmunorreguladores, promotores del sistema antioxidante enzimático y de la microcirculación (Meng y cols. 2005), reguladores del Ca^{2+} intracelular y estabilizadores de membranas lipídicas (Ma y cols., 2011), entre otros mecanismos. En el futuro, como otros autores apuntan (Pezzilli y cols., 2004; Fantini y cols., 2006; Chen y cols., 2008; Eşrefoğlu, 2012), una administración temprana de cócteles antioxidantes, como monoterapia o en combinación con otras estrategias exitosas (alimentación enteral y/o probióticos) podría reducir aún más las tasas de mortalidad, evitando la evolución necrótica y las consiguientes infecciones. Asimismo, podría ser interesante diseñar

moléculas antioxidantes capaces de acumularse preferentemente en la mitocondria, principal fuente intracelular de ERO (Sheu y cols., 2006) y no infravalorar el efecto protector de la melatonina endógena en las fases iniciales de la PA en humanos, como avisa Belyaev y cols. (2011).

En conclusión, en la actualidad existen multitud de evidencias científicas que han ayudado a clarificar algunos aspectos sobre la implicación del estrés oxidativo en la PA. Sin embargo, todavía existen muchas preguntas que continúan sin respuesta. La presente Tesis Doctoral confirma las propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras de la melatonina y el resveratrol como agentes quimiopreventivos de la PA inducida por ceruleína en ratas. El carácter inocuo de ambos antioxidantes a bajas dosis convertiría la suplementación antioxidante en una práctica clínica segura. No obstante, dado que los resultados experimentales obtenidos hasta el momento no son concluyentes, es necesario llevar a cabo más estudios que permitan comprender como están integrados todos los factores implicados en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad, y cómo los diferentes niveles de actuación de las moléculas antioxidantes podrían llegar a ser dirigidos para contrarrestar vías de señalización patológicas específicas. Asimismo, estos ensayos ayudarían a determinar la viabilidad de la traslación de los efectos saludables de dietas como la mediterránea a la práctica clínica y, por tanto, si dicha suplementación, sola o en combinación con otras estrategias, es tan útil en humanos como en las especies animales estudiadas hasta el momento.

6. CONCLUSIONES

Tras analizar los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral en relación a la evaluación del efecto quimiopreventivo de antioxidantes (melatonina y resveratrol) en un modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína en rata Wistar, se puede concluir que:

1. La administración exógena de melatonina previene tanto las alteraciones estructurales en el páncreas exocrino, como la hiperamilasemia e hiperlipidemia séricas provocadas por inyecciones sucesivas de ceruleína durante el proceso de inducción de la pancreatitis aguda.
2. La melatonina ejerce su función pancreatoprotectora a través de sus propiedades antioxidantes e inmunorreguladoras. Al comparar con los resultados obtenidos para ratas pancreáticas, la administración exógena de melatonina revierte los niveles séricos aumentados de corticosterona y de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α , en favor del aumento de los niveles de la capacidad antioxidante total y de la de citocina anti-inflamatoria IL-4. De este modo, la melatonina es capaz de contrarrestar los fenómenos oxidativos e inflamatorios concurrentes en las primeras fases de la enfermedad.
3. A nivel local, el tratamiento quimiopreventivo con melatonina promueve la actuación del sistema de defensa antioxidante endógeno, como demuestra la elevación de los niveles tisulares de la capacidad antioxidante total y de la enzima glutatión peroxidasa en las ratas pre-tratadas con el indol. Por otro parte, contribuye a la reducción de fenómenos causantes de daño oxidativo orgánico, como son la lipoperoxidación y la oxidación proteica, observándose una menor incidencia de éstos en los páncreas de las ratas pre-tratadas con melatonina con respecto a las ratas pancreáticas.
4. La suplementación con resveratrol muestra asimismo un efecto protector sobre la integridad de la arquitectura pancreática, previniendo la hiperamilasemia e hiperlipidemia séricas causadas por inyecciones sucesivas de ceruleína.
5. Al comparar con los resultados obtenidos para las ratas pancreáticas, y del mismo modo que sucedía con la melatonina, el tratamiento quimiopreventivo con resveratrol revierte los niveles séricos aumentados de corticosterona y de la citocina pro-inflamatoria IL-1 β , en favor del aumento de los niveles de la capacidad antioxidante total y de la citocina anti-inflamatoria IL-10. A nivel local, promueve la actuación del sistema de defensa antioxidante endógeno, como demuestra la elevación de los niveles tisulares de la capacidad antioxidante total y de las enzimas glutatión peroxidasa y

superóxido dismutasa en las ratas pre-tratadas con resveratrol, colaborando en la prevención de daño oxidativo como la lipoperoxidación.

6. Por último, la administración exógena de resveratrol previene la alteración de la señal fisiológica de Ca^{2+} intracelular en las células acinares pancreáticas, gracias a la capacidad del polifenol de regular la homeostasis del ión a distintos niveles.

Por tanto, como **Conclusión General** de la presente Tesis Doctoral podemos indicar que el tratamiento quimiopreventivo con antioxidantes (melatonina y resveratrol) de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína previene la hiperamilasemia e hiperlipidemia séricas, así como el daño oxidativo (lipoperoxidación y oxidación proteica) y las consecuentes alteraciones estructurales pancreáticas. Dichos antioxidantes parecen ejercer su función pancreatoprotectora a través de sus propiedades antioxidantes e inmunorreguladoras, actuando como *scavengers*, promoviendo la actuación del sistema endógeno de defensa antioxidante a nivel local y sistémico y regulando tanto la homeostasis del Ca^{2+} intracelular como el equilibrio entre los niveles de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

6. CONCLUSÕES

Após analisar os resultados obtidos nesta Tese de Doutorado em relação à avaliação do efeito quimiopreventivo de antioxidantes (melatonina e resveratrol) num modelo experimental de pancreatite aguda induzida por ceruleína em rato Wistar, pode concluir-se que:

1. A administração exógena de melatonina previne quer as alterações estruturais no pâncreas exócrino quer a hiperamilasemia e a hiperlipidemia séricas causadas pelas injeções sucessivas de ceruleína durante o processo de indução da pancreatite aguda.
2. A melatonina exerce a sua função pancreatoprotetora através das suas propriedades antioxidantes e imunoreguladoras. Comparando com os resultados obtidos para os ratos pancreatíticos, a administração de melatonina reverte o aumento dos níveis séricos de corticosterona e de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α em favor do aumento dos níveis de capacidade antioxidante total e da citocina anti-inflamatória IL-4. Assim, a melatonina é capaz de neutralizar os fenómenos oxidativos e inflamatórios concomitantes nas fases iniciais da doença.
3. Localmente, o tratamento quimiopreventivo com melatonina promove a ação do sistema de defesa antioxidante endógeno, tal como evidenciado pelos níveis teciduais elevados de capacidade antioxidante total e glutatona peroxidase nos ratos pré-tratados com o indol. Por outro lado, contribui para a redução dos fenómenos biológicos causadores de lesões oxidativas orgânicas, tais como a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas, mostrando uma incidência inferior do mesmo no pâncreas de ratos pré-tratados com melatonina em comparação com os ratos pancreatíticos.
4. A suplementação com resveratrol mostra também um efeito protetor sobre a integridade da arquitetura pancreática, previndo a hiperamilasemia e a hiperlipidemia séricas causadas pelas injeções sucessivas de ceruleína.
5. Comparando com os resultados obtidos para os ratos pancreatíticos, e tal como aconteceu com a melatonina, o tratamento quimiopreventivo com resveratrol reverte o aumento dos níveis séricos de corticosterona e citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , em favor do aumento dos níveis da capacidade antioxidante total e da citocina anti-inflamatória de IL-10. Localmente, promove a ação do sistema de defesa antioxidante endógeno, tal como evidenciado pelos níveis teciduais elevados de capacidade antioxidante total e das enzimas glutatona peroxidase e superóxido dismutase nos ratos pré-tratados com resveratrol, contribuindo para a prevenção de dano oxidativo como a peroxidação lipídica.

6. Finalmente, a administração exógena de resveratrol previne a alteração da sinal fisiológica de Ca^{2+} intracelular nas células acinais pancreáticas, devido à capacidade do polifenol para regular a homeostase iônica em distintos níveis.

Portanto, como **Conclusão Geral** da presente Tese de Doutorado podemos indicar que o tratamento quimipreventivo com antioxidantes (melatonina e resveratrol) da pancreatite aguda induzida por ceruleína previne a hiperamilasemia e hiperlipidemia séricas, o dano oxidativo (peroxidação lipídica e oxidação proteica) e as conseqüentes alterações estruturais pancreáticas. Estes antioxidantes parecem exercer a sua função pancreatoprotetora através das suas propriedades antioxidantes e imunoreguladoras, atuando como *scavengers*, promovendo a atuação do sistema endógeno de defesa antioxidante nos níveis local e sistêmico e regulando quer a homeostase do Ca^{2+} intracelular quer o equilíbrio entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alhan E, Kalyoncu NI, Kural BV, Erçin C.** Effects of melatonin on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Z Gastroenterol* 2004;42:967–972.
- Antunes F, Barclay LR, Ingold KU, King M, Norris JQ, Scaiano JC, Xi F.** On the antioxidant activity of melatonin. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:117-128.
- Arendt J.** Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms.* 2005;20:291-303.
- Armengol, M.** Interleucinas como factores predictivos de la evolución de la evolución de la pancreatitis aguda. *Cir Esp* 2000;68:185-187.
- Armstrong JA, Cash N, Soares PM, Souza MH, Sutton R, Criddle DN.** Oxidative stress in acute pancreatitis: lost in translation? *Free Radic Res.* 2013;47:917-33.
- Barlas A, Cevik H, Arbak S, Bangir D, Sener G, Yegen C, Yegen BC.** Melatonin protects against pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats: role of neutrophils. *J Pineal Res* 2004;37:267-275.
- Beger HG, Büchler M, Bittner R, Block S, Nevalainen T, Roscher R.** Necrosectomy and postoperative local lavage in necrotizing pancreatitis. *Br J Surg* 1988;75:207–212.
- Beger HG.** Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage?. *Ann Surg.* 2000;231:352-360.
- Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB.** Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res.* 2009;46:392-400.
- Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB.** Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011;108:14-20.
- Bejarano I, Espino J, Marchena AM, Barriga C, Paredes SD, Rodríguez AB, Pariente JA.** Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Mol Cell Biochem.* 2011;353:167-176.
- Belyaev O, Herzog T, Munding J, Bolik B, Vosschulte A, Uhl W, Müller CA.** Protective role of endogenous melatonin in the early course of human acute pancreatitis. *J Pineal Res* 2011;50: 71-77.
- Benot S, Goberna R, Reiter RJ, Garcia-Mauriño S, Osuna C, Guerrero JM.** Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. *J Pineal Res* 1999;27:59-64.
- Blamey SL, Imrie CW, O'Neill J, Gilmour WH, Carter DC.** Prognostic factors in acute pancreatitis. *Gut.* 1984;25:1340 –1346.
- Braganza JM.** Mast cell: pivotal player in lethal acute pancreatitis. *QJM* 2000;93:469–76.
- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
- Bradley EL 3rd.** A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg.* 1993;128:586-590.
- Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH.** Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13659.
- Bonnefont-Rousselot D, Collin F.** Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology.* 2010;278:55-67.

- Bubenik GA.** Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59:33-51.
- Büchler MW, Gloor B, Müller CA, Fries H, Seiler CA, Uhl W.** Acute necrotizing pancreatitis: treatment strategy according to the status of infection. *Ann Surg* 2000;232:619–626.
- Carvalho KM, Morais TC, de Melo TS, de Castro Brito GA, de Andrade GM, Rao VS, Santos FA.** The natural flavonoid quercetin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Biol Pharm Bull* 2010;33:1534–1539
- Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK.** Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol.* 2012;3:141.
- Cerqueira F, Medeiro MH, Augusto O.** Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova* 2007;30:441-449.
- Chachay VS, Kirkpatrick CM, Hickman IJ, Ferguson M, Prins JB, Martin JH.** Resveratrol--pills to replace a healthy diet? *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72:27-38.
- Charlton KE.** Eating well: ageing gracefully! *Asia Pac J Clin Nutr* 2002;11:S607-617.
- Chen HM, Hsu JT, Chen JC, Ng CJ, Chiu DF, Chen MF.** Delayed neutrophil apoptosis attenuated by melatonin in human acute pancreatitis. *Pancreas* 2005;31: 360-364
- Chen C, Xia SH, Chen H, Li XH.** Therapy for acute pancreatitis with platelet-activating factor receptor antagonists. *World J Gastroenterol.* 2008;14:4735-4738.
- Chiari H:** Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Z Heilk* 1896;17:69-96.
- Chuang JI, Mohan N, Meltz ML, Reiter RJ.** Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell Biol Int* 1996;20:687–692.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G.** The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005;9:11-24.
- Çöl C, Dinler K, Hasdemir AO, Bugdayci G.** The effect of an intraperitoneal injection of melatonin on serum amylase levels in acute pancreatitis. *QJM* 2009;10:306–309.
- Çöl C, Dinler K, Hasdemir O, Buyukasik O, Bugdayci G.** Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010;9:78–82.
- Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Galletti P, Zappia V, Della Ragione F.** Resveratrol: from basic science to the clinic. *Cell Cycle.* 2007;6:2495-2510.
- Culpitt SV, Rogers DF, Fenwick PS, Shah P, De Matos C, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE.** Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax* 2003;58:942–946
- Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, Gabryelewicz A.** Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol.* 1999;377:1-11.
- Del Maestro RF, Bjork J, Arfors KE.** Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. *Microvasc Res* 1982;22:255–270.
- Delgado J, Terrón MP, Garrido M, Barriga C, Espino J, Paredes SD, Rodríguez AB.** Jerte Valley cherry-based product modulates serum inflammatory markers in rats and ringdoves. *J Appl Biomed* 2012;10:41-50.
- Ding SP, Li JC, Jin C.** A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide. *World J Gastroenterol* 2003;9:584-549.

- Dormandy TL.** Free-radical reaction in biological systems. *Ann R Coll Surg Engl.* 1980;62:188-194.
- Eşrefoglu M, Gül M, Ates B, Batçioğlu K, Selimoğlu MA.** Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12:259–264.
- Espino J, Bejarano I, Redondo PC, Rosado JA, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB.** Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. *J Membr Biol.* 2010;233:105-18.
- Espino J, Bejarano I, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB.** Melatonin is able to delay endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in leukocytes from elderly humans. *Age (Dordr).* 2011;33:497-507.
- Eşrefoglu M, Gül M, Ates B, Batçioğlu K, Selimoğlu MA.** Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006;12:259–264.
- Esrefoglu M.** Experimental and clinical evidence of anti-oxidant therapy in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2012;18:5533–5541.
- Exley AR, Leese T, Holliday MP, Swann RA, Cohen J.** Endotoxaemia and serum tumour necrosis factor as prognostic markers in severe acute pancreatitis. *Gut.* 1992;33:1126-1128.
- Fantini L, Tomassetti P, Pezilli R.** Management of acute pancreatitis: current knowledge and future perspectives. *World J Emerg Surg.* 2006;1:16.
- Fitz RH.** Acute pancreatitis: a consideration of pancreatic hemorrhage, hemorrhagic, suppurative, and gangrenous pancreatitis, and of disseminated fat-necrosis. *Boston Med Surg J* 1889;120:181-187, 205-207, 229-235.
- Franco AA, Odom RS, Rando TA.** Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:1122-1132.
- Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC.** Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1299–1308.
- Garrido M, Rodríguez AB, Terrón MP.** Aging: Oxidative stress and dietary antioxidants. Chapter 13: Tryptophan and melatonin-enriched foodstuffs to improve antioxidant status in aging (129-134). Preedy VR (Ed.), Elsevier (UK), 2014.
- Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay BD, Ozturk H, Buyukbayram H.** Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2008;14:7101–7106
- Gescher AJ1, Steward WP.** Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12:953-957.
- Gonzalez A, Schmid A, Salido GM, Camello PJ, Pariente JA.** XOD-catalyzed ROS generation mobilizes calcium from intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* 2002;14:153–159.
- Granados MP, Salido GM, Pariente JA, González A.** Generation of ROS in response to CCK-8 stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *Mitochondrion* 2004;3:285–296.

- Granados MP, Salido GM, González A, Pariente JA.** Dose-dependent effect of hydrogen peroxide on calcium mobilization in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem Cell Biol.* 2006;84:39-48.
- Granados MP, Salido GM, Pariente JA, González A.** Effect of H₂O₂ on CCK-8-evoked changes in mitochondrial activity in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Biol Cell.* 2005;97:847-56.
- Granel S, Serrano-Mollar A, Folch-Puy E, Navajas D, Farre R, Bulbena O, Closa D.** Oxygen in the alveolar air space mediates lung inflammation in acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:1640-1647.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY.** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440–3450.
- Gutteridge JM.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41:1819-1828.
- Halliwell B, Cross CE.** Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994;102:5-12.
- Halliwell B.** The antioxidant paradox. *Lancet* (2000);355:1179–1180
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free radicals in biology and medicine. Clarendon, Oxford (2007)
- Halliwell B.** The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med.* 2009;46:531-542.
- Hardeland R.** Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:2001-2018.
- Heinrich S, Schäfer M, Rousson V, Clavien PA.** Evidence-based treatment of acute pancreatitis: a look at established paradigms. *Ann Surg.* 2006;243:154-168.
- Jaworek J, Konturek SJ, Leja-Szpak A, Nawrot K, Bonior J, Tomaszewska R, Stachura J, Pawlik WW.** Role of endogenous melatonin and its MT₂ receptor in the modulation of caerulein-induced pancreatitis in the rat. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53:791–804.
- Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J, Nawrot K, Tomaszewska R, Stachura J, Sendur R, Pawlik W, Brzozowski T, Konturek SJ.** Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* 2003;34:40–52.
- Jaworek J, Konturek SJ, Tomaszewska R, Leja-Szpak A, Bonior J, Nawrot K, Palonek M, Stachura J, Pawlik WW.** The circadian rhythm of melatonin modulates the severity of caerulein-induced pancreatitis in the rat. *J Pineal Res.* 2004;37:161-170.
- Jaworek J, Zwirska-Korczala K, Szklarczyk J, Nawrot-Porąbka K, Leja-Szpak A, Jaworek AK, Tomaszewska R.** Pinealectomy aggravates acute pancreatitis in the rat. *Pharmacol Rep.* 2010;62:864-873.
- Jaworek J, Szklarczyk J, Jaworek AK, Nawrot-Porąbka K, Leja-Szpak A, Bonior J, Kot M.** Protective effect of melatonin on acute pancreatitis. *Int J Inflamm* 2012;2012:173675
- Johnson CD, Kingsnorth AN, Imrie CW, McMahon MJ, Neoptolemos JP, McKay C, Toh SK, Skaife P, Leeder PC, Wilson P, Larvin M, Curtis LD.** Double blind, randomized, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment of prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis. *Gut.* 2001;48:62-69.
- Johnson CD, Abu-Hilal M.** Persistent organ failure during the first week as a marker of fatal outcome in acute pancreatitis. *Gut.* 2004;53:1340-1344.
- Jung KH, Hong SW, Zheng HM, Lee HS, Lee H, Lee DH, Lee SY, Hong SS.** Melatonin ameliorates caerulein-induced pancreatitis by modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2

and nuclear factor-kappaB in rats. *J Pineal Res* 2010 48:239–250.

Jungermann J, Lerch MM, Weidenbach H, et al. Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation. *Am J Physiol* 1995;268:G328.

Kelley WN. *Medicina Interna. Editorial Panamericana, 2º edición (1992).*

Kern HF, Adler G, Scheele GA. Structural and biochemical characterization of maximal and supramaximal hormonal stimulation of rat exocrine pancreas. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1985;112:20-9.

Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985;13:818–829.

Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Czesnikiewicz-Guzik M, Kwiecien S, Brzozowski T, Bubenik GA, Pawlik WW. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol.* 2007;58:381-405.

Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med.* 2009;15:43-50.

Kuliaviene I, Gulbinas A, Cremers J, Pundzius J, Kupcinskas L, Dambrauskas Z, Pundzius J, Kupcinskas L, Dambrauskas Z, Jansen E. Fatty acids of erythrocyte membrane in acute pancreatitis patients. *World J Gastroenterol.* 2013;19:5678-5684.

Lampel M, Kern HF. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch path Anat Histol* 1977;373:97-117.

Lerner AB, Case JD, Takakashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958;80:2587.

Leung P, Chan Y. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:135–166

Li ZD, Ma QY, Wang CA. Effect of resveratrol on pancreatic oxygen free radicals in rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006;12:137–140

Lima PR, de Melo TS, Carvalho KM, de Oliveira ÍB, Arruda BR, de Castro Brito GA, Rao VS, Santos FA. 1,8-cineole (eucalyptol) ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis via modulation of cytokines, oxidative stress and NF-κB activity in mice. *Life Sci.* 2013;92:1195-201.

Lizarazo JI. Fisiopatología de la pancreatitis aguda. *Rev Col Gastroenterol* 2008;23:187-191.

Ma ZH, Ma QY, Wang LC, Sha HC, Wu SL, Zhang M. Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. *Inflamm Res* 2005;54:522–527,

Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 2000; 15:6509–6519

Matull WR, Pereira SP, O'Donohue JW. Biochemical markers of acute pancreatitis. *J Clin Pathol.* 2006;59:340-344.

Mayerle J, Sandler M, Lerch MM. Secretagogue (Caerulein) induced pancreatitis in rodents, [en línea] DOI: 10.3998/panc.2013.2. The Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base 2013. Disponible en: http://www.pancreapedia.org/sites/www.pancreapedia.org/files/mayerle_et_al_secretagogue_induced_pancreatitis_pdf.pdf.

Matull WR, Pereira SP, O'Donohue JW. Biochemical markers of acute pancreatitis. *J Clin Pathol* 2006;59:340–344

- Meng Y, Ma QY, Kou XP, Xu J.** Effect of resveratrol on activation of nuclear factor kappa-B and inflammatory factors in rat model of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11:525–528
- Mouret J.** Contribution á l'étude des cellules glandulaires (pancreas). *J Anat Physiol* 1895;31:221-236.
- Moynihan B.** Acute pancreatitis. *Ann Surg* 1925;81:132-142.
- Nakata R, Takahashi S, Inoue H.** Recent advances in the study on resveratrol. *Biol Pharm Bull.* 2012;35:273-279.
- Navarro S, Amador J, Argüello L, Ayuso C, Boadas J, de las Heras G, Farré A, Fernández-Cruz L, Ginés A, Guarner L, López A, Llach J, Lluís F, Madaria E, Martínez J, Mato R, Molero X, Oms L, Pérez-Mateo M, Vaquero E.** Recomendaciones del Club Español Biliopancreático para el Tratamiento de la Pancreatitis Aguda. Conferencia de Consenso. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31:366–387
- Neoptolemos JP, Raraty M, Finch M, Sutton R.** Acute pancreatitis: the substantial human and financial costs. *Gut.* 1998;42:886-891.
- Netter FH.** Colección Ciba de Ilustraciones Médicas. Tomo III/3 Sistema Digestivo: Hígado, vías biliares y páncreas. SALVAT Editores, 1994.
- Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH.** Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology.* 1985;88:1192-1204.
- Niederau C, Klonowski H, Schulz HU, Sarbia M, Lüthen R, Häussinger D.** Oxidative injury to isolated rat pancreatic acinar cells vs. isolated zymogen granules. *Free Radic Biol Med* 1996;20:877–886.
- Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A.** Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon. (*Polygonum Capsidatum*-SIEB et ZUCC). *Yakugaku Zasshi* 1963;83:988–990
- Norman J.** The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg.* 1998; 175:76-83.
- Opitz H, Schimd F.** Enciclopedia Pediátrica. Digestión: Páncreas (pág. 1325-1327). Ediciones Morata S.A., 1967.
- Özkan E, Akyüz C, Dulundu E, Topaloglu U, Sehirlí AÖ, Ercan F, Sener G.** Protective effects of lycopene on cerulein induced experimental acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* (2012);176:232–238
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP.** Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2008;85:335-53.
- Papachristou GI.** Prediction of severe acute pancreatitis: current knowledge and novel insights. *World J Gastroenterol.* 2008;14:6273-6275.
- Pariante JA, Camello C, Camello PJ, Salido GM.** Release of calcium from mitochondrial and nonmitochondrial intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells by hydrogen peroxide. *J Membr Biol.* 2001;179:27-35.
- Park BK, Chung JB, Lee JH, Suh JH, Park SW, Song SY, Kim H, Kim KH, Kang JK.** Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2003;9:2266-2269.
- Pervaiz S.** Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J.* 2003;17:1975-1985.
- Petersen OH.** Ca²⁺ signalling in pancreatic acinar cells: physiology and pathophysiology. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:9–16
- Pezzilli R, Morselli-Labate AM, Miniero R, Barakat B, Fiocchi M, Cappelletti O.** Simultaneous serum assays of lipase and interleukin-6 for early diagnosis and prognosis of acute pancreatitis. *Clin Chem.* 1999;45:1762-1767.

- Pezzilli R, Ceciliato R, Barakat B, Corinaldesi R.** Immunemanipulation of the inflammatory response in acute pancreatitis. What can be expected? *JOP* 2004;5:115–121
- Pocock G, Richards CD.** Fisiología Humana. La base de la Medicina. Editorial Masson. 2ª Edición, 2005.
- Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, Ijaz T, Ruparelia KC, Lamb JH, Farmer PB, Stanley LA, Burke MD.** The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br J Cancer* 2002;86:774–778.
- Qi W, Tan DX, Reiter RJ, Kim SJ, Manchester LC, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC.** Melatonin reduces lipid peroxidation and tissue edema in caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1999;44:2257–2262.
- Ramudo L, Manso MA, Vicente S, De Dios I.** Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis. Effect of N-acetyl cysteine. *Cytokine* 2005;32:125–31
- Ranson JH, Rifkind KM, Turner JW.** Prognostic signs and nonoperative peritoneal lavage in acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet.* 1976;143:209–219.
- Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nüssler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG.** Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? *Ann Surg* 2000;231:352–360.
- Reinheckel T, Nedelew B, Prause J, Augustin W, Schulz HU, Lippert H, Halangk W.** Occurrence of oxidatively modified proteins: an early event in experimental acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 1998;24:393–400.
- Renaud S, de Lorgeril M.** Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992;339:1523-1526.
- Rodríguez M, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ.** Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004;36:1–9.
- Rosado JA, González A, Salido GM, Pariente JA.** Effects of reactive oxygen species on actin filament polymerisation and amylase secretion in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal.* 2002;14:547-556.
- Ross P.** Histología, texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana. 5ª Edición, 2001.
- Rush JW, Quadrilatero J, Levy AS, Ford RJ.** Chronic resveratrol enhances endothelium-dependent relaxation but does not alter eNOS levels in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:814-822.
- Sah RP, Garg P, Saluja AK.** Pathogenic mechanisms of acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2012;28:507–515 .
- Saluja A, Saito I, Saluja M, Houlihan MJ, Powers RE, Meldolesi J, Steer M.** In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. *Am J Physiol.* 1985;249:G702-710.
- San Román JI, De Dios I, Manso MA, Calvo JJ, López MA.** Caerulein-induced acute pancreatitis in the rat. Pancreatic secretory response to cholecystokinin. *Arch Int Physiol Biochim.* 1990;98:237-243.
- Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL.** The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1984;200: 405-413.
- Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL.** A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44–56.
- Sheu SS, Nauduri D, Ander MW.** Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochem Biophys Acta* 2006;1762:256–265

- Sies, H.** Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 1993;215:213-219.
- Sourdeval M, Lemaire C, Deniaud A, Taysse L, Daulon S, Breton P, Brenner C, Boisvieux-Ulrich E, Marano F.** Inhibition of caspase-dependent mitochondrial permeability transition protects airway epithelial cells against mustard-induced apoptosis. *Apoptosis* 2006;11:1545–1559.
- Spitzer AL, Barcia AM, Schell MT, Barber A, Norman J, Grendell J, Harris HW.** Applying Ockham's razor to pancreatitis prognostication: a four-variable predictive model. *Ann Surg.* 2006;243:380-388.
- Steinberg W, Tenner S.** Acute pancreatitis. *N Engl J Med.* 1994;330:1198-1210.
- Stimac D, Mikolasevic I, Krznaric-Zrnac I, Radic M, Milic S.** Epidemiology of Acute Pancreatitis in the North Adriatic Region of Croatia during the Last Ten Years. *Gastroenterol Res Pract.* 2013;2013:956149.
- Strand R.** Towards a useful philosophy of biochemistry: sketches and examples. *Foundations of Chemistry* (1999);1:271–294
- Su KH, Cuthbertson C, Christophi C.** Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB (Oxford)* 2006;8:264-286.
- Sutton R, Criddle D, Raraty MG, Tepikin A, Neoptolemos JP, Petersen OH.** Signal transduction, calcium and acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003;3:497–505
- Szabolcs A, Varga IS, Varga C, Berkó A, Kaszaki J, Tizslavicz L, Letoha T, Sári R, Lonovics J, Takács T.** Beneficial effect of resveratrol on cholecystokinin-induced experimental pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2006;532:187–193.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ.** Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1:57–60.
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, Reiter RJ.** N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 2001; 15:2294–2296.
- Tian R, Tan JT, Wang RL, Xie H, Qian YB, Yu KL.** The role of intestinal mucosa oxidative stress in gut barrier dysfunction of severe acute pancreatitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17:349-355.
- Tresguerres JAF.** *Fisiología Humana. Fisiología del Sistema Digestivo. Capítulo 64: Fisiología del Páncreas Exocrino* (pág. 792-799). Ed. Interamericana - McGraw-Hill, 1992.
- Ungvari Z, Sonntag WE, de Cabo R, Baur JA, Csiszar A.** Mitochondrial protection by Resveratrol. *Exerc Sport Sci Rev* 2011;39:128-132.
- Uruñuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I.** Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1588:159-164.
- Wahlqvist ML.** Antioxidant relevance to human health. *Asia Pac J Clin Nutr* 2013;22:171-176.
- Watanabe O, Baccino FM, Steer ML, Meldolesi J.** Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Am J Physiol.* 1984;246:G457-467.
- Werner J, Feuerbach S, Uhl W, Büchler MW.** Management of acute pancreatitis: from surgery to interventional intensive care. *Gut.* 2005 Mar;54(3):426-36.
- Wisner J, Green D, Ferrell L, Renner I.** Evidence for a role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of caerulein induced acute pancreatitis in rats. *Gut* 1988;29:1516–1523

World Health Organisation. World health statistics annual. Geneva: World Health Organisation, 1989.

Wu XN. Current concept of pathogenesis of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2000;6:32–36

Xu M, Ashraf M. Melatonin protection against lethal myocyte injury induced by doxorubicin as reflected by effects on mitochondrial membrane potential. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002;34:75–79.

Zhang XP, Li ZJ, Zhang J. Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2009;8:351-357.

Zhang DQ, Feng H, Chen WC. Effects of hydrogen-rich saline on taurocholate-induced acute pancreatitis in rat. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:731932.

Zhao JB, Liao DH, Nissen TD. Animal models of pancreatitis: can it be translated to human pain study? *World J Gastroenterol.* 2013;19:7222-7230.

Zhong M, Cheng GF, Wang WJ, Guo Y, Zhu XY, Zhang JT. Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. *Phytomedicine* 1999; 6:79–84

Zyromski N, Murr MM. Evolving concepts in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Surgery.* 2003;133:235-237.

