



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA

**RESPUESTA INFLAMATORIA DE LA  
CÉLULA ACINAR A DIFERENTES LÍPIDOS  
GENERADOS EN GRASA NECRÓTICA  
DURANTE LA PANCREATITIS AGUDA**

**- TESIS DOCTORAL -**

**ALBERTO MATEU RICO**

**SALAMANCA, 2016**





**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA**

**RESPUESTA INFLAMATORIA DE LA  
CÉLULA ACINAR A DIFERENTES LÍPIDOS  
GENERADOS EN GRASA NECRÓTICA  
DURANTE LA PANCREATITIS AGUDA**

Memoria que presenta **D. ALBERTO MATEU RICO** para optar al

Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

**SALAMANCA, 2016**





D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> JESÚS MONTE RÍO, Directora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada **“RESPUESTA INFLAMATORIA DE LA CÉLULA ACINAR A DIFERENTES LÍPIDOS GENERADOS EN GRASA NECRÓTICA DURANTE LA PANCREATITIS AGUDA”** presentada por D. Alberto Mateu Rico para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Isabel De Dios Bayón, Catedrática de Fisiología de la Universidad de Salamanca, y D<sup>a</sup>. Laura Ramudo González, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día veintisiete de noviembre de dos mil quince.

Fdo. M<sup>a</sup> Jesús Monte Río





M<sup>a</sup> ISABEL DE DIOS BAYÓN, Catedrática de Fisiología de la Universidad de Salamanca, y LAURA RAMUDO GONZÁLEZ, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado **“RESPUESTA INFLAMATORIA DE LA CÉLULA ACINAR A DIFERENTES LÍPIDOS GENERADOS EN GRASA NECRÓTICA DURANTE LA PANCREATITIS AGUDA”** y realizado por el Licenciado en Biología Alberto Mateu Rico, ha sido desarrollado bajo su dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su exposición y defensa ante un Tribunal.

Salamanca, a veintisiete de noviembre de 2015

Fdo.: M<sup>a</sup> Isabel De Dios Bayón

Fdo.: Laura Ramudo González





Este Trabajo ha sido realizado con cargo a Proyectos de Investigación subvencionados por la Universidad de Salamanca (USAL 13/18KAL7) y la Junta de Castilla y León (BIO/SA63/14).



## AGRADECIMIENTOS



Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me habéis acompañado en esta experiencia y habéis hecho posible que hoy ponga fin a una etapa de mi vida llena de momentos especiales que recordaré siempre, experiencias vividas que me han hecho crecer como persona. Por ello, quiero reflejar en esta Memoria lo agradecido que estoy por el apoyo que me habéis brindado.

A Maribel y Manolo, muchas gracias por haberme dado la oportunidad de iniciarme en la investigación. La preocupación que habéis mostrado de que yo estuviera siempre en las mejores condiciones es algo que no podré olvidar. Desde el primer día que pasé a formar parte del grupo, me habéis hecho sentir el calor que uno siente cuando está en familia. Sois mis “padres científicos”, me habéis enseñado de forma inmejorable lo que es Ciencia, a pensar por mí mismo y, sobre todo, me habéis enseñado a ser más humano y mejor persona. Vuestra sabiduría y vuestros consejos es algo que recordaré siempre y por lo que os estoy enormemente agradecido.

A Laura, mi “hermana” en esta pequeña familia. Gracias no solo por enseñarme a trabajar en un laboratorio y por aconsejarme en lo científico, sino también por haber estado siempre disponible, dispuesta para lo que necesitara, para las alegrías y también cuando he necesitado un hombro. Gracias, gracias y gracias. No quisiera pasar al siguiente párrafo sin mencionar al pequeño Javier, al que le deseo un crecimiento sano y lleno de felicidad.

A Juan Manuel Corchado, por haber contribuido enormemente a que este proyecto se llevara a cabo. El apoyo, confianza y altruismo que ha mostrado hacia mí es algo que recordaré con enorme gratitud.

A todas aquellas personas del Edificio Departamental que han hecho más llevaderos los días, especialmente Javi y Maribel, por esos momentos de desconexión. También quiero agradecer a José Fernando, del S.E.A. de la USAL, su ayuda y eficaz trabajo. A César, del Servicio de Espectrometría de Masas, por su asistencia técnica.

A Leire y Carmen Ortega, por ser, simplemente, las mejores. Hace ya muchos años que nuestros caminos se cruzaron y, desde entonces, no hemos hecho otra cosa que caminar juntos, sorteando obstáculos y celebrando las alegrías. Gracias por todo, por estar siempre ahí y por enseñarme el verdadero significado de la amistad.

A los “Blade Runners”, Cris, Meri, Estefi, Cati, Dani y Hugo, mi pequeña gran familia salmantina. Vosotros sois los que habéis sufrido mis alegrías y los que me habéis ayudado a levantar en mis tropiezos. No perdemos la ocasión para organizar una cena, una excursión a Monfragüe, o una carrera, pero eso es precisamente lo que nos llevamos, la alegría de compartir momentos mágicos con los nuestros. Os doy las gracias porque os habéis convertido en un pilar importante de mi vida y, aunque esto no suelo decirlo, ¡os quiero, chicos!

A la “biofarma pandy”, porque a pesar de la distancia, seguimos estando tan unidos como siempre, planeando escapadas fugaces allá donde haga falta con tal de compartir unas risas. Sois, sin duda alguna, los amigos que cualquiera desearía tener.

A mi “Compi-Killer” padelera Ana, por demostrarme que no hay techo que nos impida seguir mejorando. Gracias por los momentos dentro y fuera de la pista, la cerveza y la jeta, en buena compañía, ¡saben mejor!

A los “Cucs de Garrova”, esos “gustiners” de (y para) siempre, por apoyarme en todo, porque sin vosotros, no sería quien soy hoy.

A mis hermanos Jaime y Alejandro, dos personas de las que no paro de aprender y a las que admiro. Porque me conocéis mejor que nadie y siempre habéis estado al pie del cañón para lo que hiciera falta. Os quiero. También quiero dedicar este trabajo a mi “cuñi” María por enseñarme lo que es ser feliz, y a Marimar, por cuidar de Alejandro tan bien como lo haces.

A mis abuelas y a Maite, por ser las personas más maravillosas que pude conocer y de quien aprendí grandes lecciones de cómo vivir y afrontar la vida. Ojalá algún día llegue a ser la mitad de lo que fuisteis vosotras.

De una forma muy especial, quiero dedicar esta Tesis doctoral a mis padres, Toni y Lumi. A vosotros os debo más que a nadie, y no tengo palabras que puedan expresar lo que siento. Muchísimas gracias por el esfuerzo que habéis invertido en que este sueño se haya hecho realidad. Sin duda alguna, sois los mejores padres del mundo, y me siento muy orgulloso de ser vuestro hijo.

Por último, quisiera disculparme de todos aquellos a quienes no he citado explícitamente, pero a quienes les estoy muy agradecido por formar parte de mi vida.







## ABREVIATURAS



## **A**

---

**AA:** Ácido araquidónico

**AE:** Ácido esteárico

**AG:** Ácido graso

**AG-CI:** Clorhidrina de ácido graso

**AL:** Ácido linoleico

**AL-CI:** Clorhidrina de ácido linoleico

**ANOVA:** Análisis de la varianza

**AO:** Ácido oleico

**AO-CI:** Clorhidrina de ácido oleico

**AP:** Ácido palmítico

**AP-1:** Proteína activadora-1

## **C**

---

**CCL2:** Ligando 2 de la quimiocina

C-C

**CINC:** Quimiocina de neutrófilos inducida por citocinas

**cNOS:** Óxido nítrico sintasa constitutiva

**COX:** Ciclooxygenasa

**CXCL:** Ligando de quimiocinas CXC

## **D**

---

**DAG:** Diacilglicerol

**15d-PGJ2:** 15-deoxy- $\Delta$  12,14-prostaglandina J2

**DHA:** Ácido docosahexaenoico

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DTT:** Ditioneitol

## **E**

---

**EDTA:** Etilendiamina-ácido

tetraacético

**EPA:** Ácido eicosapentaenoico

**ERK:** Cinasa regulada por señales extracelulares

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

## **F**

---

**FC:** Fosfatidilcolina

**FE:** Fosfatidiletanolamina

**FL:** Fosfolípido

**FS:** Fosfatidilserina

## **G**

---

**GC:** Cromatografía de gases

## H

**HDTAB:** Hexadeciltrimetilamonio-bromuro

**HEPES:** Ácido N-(2-hidroxietil) piperazin-N'-(2-etanolsulfónico)

**HOCI:** Ácido hipocloroso

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución

## I

**ICAM:** Molécula de adhesión intercelular-1

**IL:** Interleucina

**IL-1Ra:** Antagonista del receptor de IL-1

**iNOS:** Sintasa de óxido nítrico inducible

## J

**JAK:** *Cinasa "Janus"*

**JNK/SAPK:** Cinasa "*Jun*" N-terminal/proteína cinasa activada por estrés

## L

**LDH:** Lactato deshidrogenasa

**LDL:** Lipoproteína de baja densidad

**LOX:** Lipooxigenasa

**LPS:** Lipopolisacárido

**LT:** Leucotrieno

## M

**MAPK:** Proteína cinasa activada por mitógenos

**MIP:** Proteína inflamatoria de macrófagos

**MPO:** Mieloperoxidasa

**MS:** Espectrometría de masas

## N

**NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenin-dinucleótido oxidada

**NADH:** Nicotinamida adenin-dinucleótido reducida

**NaTc:** Taurocolato sódico

**NF-κB:** Factor nuclear κB

## O

**OBP:** Obstrucción biliopancreática

## **P**

---

**PA:** Pancreatitis aguda

**PAPA:** 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfato

**PAPC:** 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina

**PAPG:** 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol

**PG:** Prostaglandina

**PKC:** Proteína cinasa C

**PLA2:** Fosfolipasa A2

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonil

**POPC:** 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

**POPC-ox:** 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina oxidada

**PPAR $\gamma$ :** Receptor activado por proliferadores de peroxisomas

## **S**

---

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SEM:** Error estándar de la media

**SOPC:** 1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

**SREBP:** Proteína de unión al elemento regulador del esterol

**STAT:** Transductor de la señal y activador de la transcripción

## **T**

---

**TA:** Tejido adiposo

**TA-C:** Tejido adiposo control

**TA-nN:** Tejido adiposo no necrótico

**TA-N:** Tejido adiposo necrótico

**TG:** Triglicérido

**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TOF:** Tiempo de vuelo

**TR:** Tiempo de retención

**TX:** Tromboxano

## **V**

---

**VCAM:** Molécula de adhesión de células vasculares



## ÍNDICE





---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>i</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. TEJIDO ADIPOSEO .....	3
2. COMPOSICIÓN DE LA GRASA .....	5
2.1. Triglicéridos .....	5
2.2. Ácidos grasos .....	6
2.3. Fosfolípidos .....	10
3. INFLUENCIA DEL TEJIDO ADIPOSEO EN PROCESOS INFLAMATORIOS .....	12
3.1. Acción de compuestos proteicos .....	12
3.1.1. Adipocinas .....	12
3.1.2. Citocinas .....	14
3.2. Acción de compuestos lipídicos .....	14
3.2.1. Ácidos grasos .....	14
3.2.2. Fosfolípidos .....	19
4. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA ACTIVIDAD DEL TEJIDO ADIPOSEO .....	21
4.1. Obesidad .....	21
4.2. Pancreatitis aguda .....	24
4.2.1. Etiología y patogenia .....	25
4.2.2. Respuesta inflamatoria .....	26
4.2.3. Participación de los lípidos en la pancreatitis aguda .....	31
4.2.3.1. Modificaciones químicas de los compuestos lipídicos .....	34
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS .....	45
2. RECOGIDA DE MUESTRAS .....	47
3. PARÁMETROS DE DIAGNÓSTICO DE PANCREATITIS AGUDA .....	48
3.1. Hematocrito .....	48
3.2. Actividad amilasa en plasma y en ascitis .....	48
3.3. Actividad lipasa en plasma y en ascitis .....	49

3.4. <i>IL-1<math>\beta</math> en plasma</i> .....	50
3.5. <i>Porcentaje de fluido en páncreas</i> .....	50
3.6. <i>Actividad de la enzima mieloperoxidasa en tejido pancreático y adiposo</i> .....	51
<b>IV. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS LIPÍDICAS</b> .....	<b>52</b>
4.1. <i>Extracción de lípidos de tejido adiposo peripancreático</i> .....	52
4.1.1. <i>Análisis de la composición</i> .....	52
4.1.2. <i>Obtención de la fracción ácidos grasos y fosfolípidos</i> .....	54
4.2. <i>Cloración de ácidos grasos</i> .....	54
4.3. <i>Transesterificación de fosfolípidos</i> .....	58
4.4. <i>Oxidación de fosfolípidos</i> .....	60
<b>5. AISLAMIENTO Y CULTIVOS DE ACINOS PANCREÁTICOS</b> .....	<b>61</b>
5.1. <i>Aislamiento</i> .....	61
5.2. <i>Cultivos</i> .....	63
5.3. <i>Actividad LDH</i> .....	64
<b>6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT</b> .....	<b>66</b>
6.1. <i>Obtención de extractos citoplasmáticos y nucleares</i> .....	66
6.2. <i>Estudio de rutas de señalización de la respuesta inflamatoria</i> .....	68
<b>7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR CUANTITATIVA (RT-qPCR)</b> .....	<b>71</b>
7.1. <i>Extracción del ARN total</i> .....	71
7.2. <i>Transcripción reversa y PCR cuantitativa</i> .....	71
<b>8. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EICOSANOIDES</b> .....	<b>73</b>
<b>9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>73</b>
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>75</b>
<b>1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE PA INDUCIDA POR TAUROCOLATO SÓDICO</b> .....	<b>77</b>
1.1. <i>Parámetros de diagnóstico</i> .....	77
1.2. <i>Tejido adiposo</i> .....	78
1.2.1. <i>Análisis de la composición</i> .....	78
1.2.2. <i>Infiltración de neutrófilos</i> .....	81
<b>2. EFECTOS DEL EXTRACTO LIPÍDICO DE TEJIDO ADIPOSO EN ACINOS PANCREÁTICOS</b> .....	<b>82</b>
2.1. <i>Daño celular</i> .....	82
2.2. <i>Respuesta inflamatoria</i> .....	83
2.2.1. <i>Expresión de genes</i> .....	83

---

2.2.2. Rutas de señalización .....	83
<b>3. EFECTOS DE LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y SUS CLORHIDRINAS EN ACINOS PANCREÁTICOS .....</b>	<b>85</b>
3.1. Daño celular .....	85
3.2. Respuesta inflamatoria en acinos pancreáticos de ratas control .....	86
3.3. Respuesta inflamatoria en acinos pancreáticos de ratas con pancreatitis aguda inducida por obstrucción biliopancreática (PA-OBP) .....	87
<b>4. EFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS INDIVIDUALES Y DE LAS CLORHIDRINAS EN ACINOS PANCREÁTICOS .....</b>	<b>87</b>
4.1. Respuesta a los ácidos grasos mayoritarios .....	88
4.1.1. Estudio dosis-respuesta .....	88
4.1.2. Rutas de señalización de la respuesta inflamatoria .....	90
4.2. Respuesta al ácido araquidónico .....	96
4.2.1. Daño celular .....	97
4.2.2. Respuesta inflamatoria .....	97
4.2.2.1. Expresión de genes .....	97
4.2.2.2. Producción de eicosanoides .....	98
4.2.2.3. Papel de los eicosanoides .....	99
4.2.2.4. Rutas de señalización .....	99
4.2.2.5. Papel del TLR4 y PPAR $\gamma$ .....	102
<b>5. ACCIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS EN ACINOS PANCREÁTICOS: EFECTOS DEL 1-PALMITOIL-2-OLEOIL-SN-GLICERO-3-FOSFOCOLINA (POPC) .....</b>	<b>106</b>
5.1. Daño celular .....	106
5.2. Respuesta inflamatoria .....	107
5.2.1. Expresión de genes .....	107
5.2.2. Rutas de señalización .....	109
5.2.2.1. Efectos inducidos por baja concentración del fosfolípido .....	111
5.2.2.2. Efectos inducidos por alta concentración del fosfolípido .....	113
<b>6. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>: TLR4 Y PPAR<math>\gamma</math> COMO DIANAS TERAPÉUTICAS EN PANCREATITIS AGUDA .....</b>	<b>114</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>117</b>
1. SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ACINAR AL EXTRACTO LIPÍDICO DE TEJIDO ADIPOSO Y A LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y SUS CLORHIDRINAS.....	119
2. SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ACINAR A ÁCIDOS GRASOS INDIVIDUALES Y A CLORHIDRINAS DE ÁCIDOS GRASOS .....	124

3. SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ACINAR A ÁCIDO ARAQUIDÓNICO .....	128
4. SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ACINAR AL FOSFOLÍPIDO 1-PALMITOIL-2- OLEOIL-SN-GLICERO-3-FOSFOCOLINA (POPC) .....	132
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>137</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>141</b>
<b>VIII. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS .....</b>	<b>169</b>

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>Tabla 1.</b> Ácidos grasos más comunes .....	8
<b>Tabla 2.</b> Glicerofosfolípidos más comunes .....	11
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
<b>Tabla 3.</b> Ácidos grasos analizados por espectrometría de masas .....	53
<b>Tabla 4.</b> Clorhidrinas de ácidos grasos analizados por espectrometría de masas .....	53
<b>Tabla 5.</b> Composición relativa de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de tejido adiposo .....	59
<b>Tabla 6.</b> Concentración y tiempo de adición a los cultivos de los diferentes inhibidores, agonistas y antagonistas .....	64
<b>Tabla 7.</b> <i>Primers</i> usados para la amplificación de ADNc mediante qPCR .....	72
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>75</b>
<b>Tabla 8.</b> Parámetros de diagnóstico de pancreatitis aguda inducida por taurocolato sódico .....	77
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de ácidos grasos en tejido adiposo peripancreático de ratas control y ratas con pancreatitis aguda inducida por taurocolato sódico .....	80
<b>Tabla 10.</b> Concentración de clorhidrinas de ácidos grasos en tejido adiposo peripancreático de ratas control y ratas con pancreatitis aguda inducida por taurocolato sódico .....	81

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>Figura 1.</b> Componentes del tejido adiposo y comunicación intercelular .....	4
<b>Figura 2.</b> Modulación fenotípica del tejido adiposo .....	24
<b>Figura 3.</b> Resumen esquemático de los principales mecanismos patogénicos de PA .....	31
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
<b>Figura 4.</b> Identificación por HPLC-MS de los ácidos grasos y clorhidrinas de ácidos grasos presentes en la fracción de ácidos grasos de tejido adiposo peripancreático de ratas control .....	55
<b>Figura 5.</b> Análisis por HPLC-MS del proceso de cloración del ácido oleico .....	56
<b>Figura 6.</b> Análisis por HPLC-MS del proceso de cloración del ácido linoleico .....	57
<b>Figura 7.</b> Análisis por HPLC-MS del proceso de cloración del ácido araquidónico .....	58
<b>Figura 8.</b> Análisis por GC-MS de los ácidos grasos presentes en la fracción de fosfolípidos de tejido adiposo .....	59
<b>Figura 9.</b> Análisis por TOF-MS de la oxidación de POPC a diferentes tiempos .....	60
<b>Figura 10.</b> Análisis por TOF-MS del proceso de oxidación de POPC .....	61
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>75</b>
<b>Figura 11.</b> Identificación de ácidos grasos, clorhidrinas de ácidos grasos y fosfolípidos de tejido adiposo peripancreático de ratas control y ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico .....	78
<b>Figura 12.</b> Composición lipídica de tejido adiposo peripancreático de ratas control y ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico .....	79
<b>Figura 13.</b> Actividad mieloperoxidasa en tejido adiposo peripancreático de ratas control y ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico .....	81
<b>Figura 14.</b> Lactato deshidrogenasa liberada en respuesta al extracto lipídico de tejido adiposo peripancreático de ratas control y ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico .....	82
<b>Figura 15.</b> Expresión de ARNm de CCL2 y P-selectina en respuesta al extracto lipídico de tejido adiposo peripancreático de ratas control y ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico .....	83
<b>Figura 16.</b> Formas fosforiladas de MAPKs y JAK en respuesta al extracto lipídico de tejido adiposo peripancreático de ratas control y ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico .....	84

<b>Figura 17.</b> Activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 en respuesta al extracto lipídico de tejido adiposo peripancreático de ratas control y ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico .....	85
<b>Figura 18.</b> Lactato deshidrogenasa liberada respuesta a la fracción de ácidos grasos o al conjunto de clorhidrinas de ácidos grasos .....	86
<b>Figura 19.</b> Expresión de ARNm de CCL2 y de P-selectina en acinos pancreáticos de ratas control en respuesta a la fracción de ácidos grasos o al conjunto de clorhidrinas de ácidos grasos .....	86
<b>Figura 20.</b> Expresión de ARNm de CCL2 en acinos pancreáticos de ratas con pancreatitis aguda inducida por obstrucción biliopancreática en respuesta a la fracción de ácidos grasos o al conjunto de clorhidrinas de ácidos grasos .....	87
<b>Figura 21.</b> Respuesta acinar a ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico o, en su caso, a clorhidrinas de ácido oleico o clorhidrinas de ácido linoleico. Dosis-respuesta en relación con la actividad lactato deshidrogenasa en el medio y expresión de ARNm de CCL2 .....	89
<b>Figura 22.</b> Comparación de la viabilidad celular y de la expresión de CCL2 en respuesta a ácido oleico y ácido linoleico o a clorhidrinas de ácido oleico o clorhidrinas de ácido linoleico .....	90
<b>Figura 23.</b> Formas fosforiladas de MAPKs y p-JAK en respuesta a ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico o a clorhidrinas de ácido oleico o clorhidrinas de ácido linoleico .....	91
<b>Figura 24.</b> Activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 en respuesta a ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, clorhidrinas de ácido oleico o clorhidrinas de ácido linoleico .....	92
<b>Figura 25.</b> Expresión de ARNm de TLR4 en respuesta a ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, clorhidrinas de ácido oleico o clorhidrinas de ácido linoleico .....	92
<b>Figura 26.</b> Efecto de los inhibidores de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 sobre la expresión de ARNm de CCL2 en respuesta a ácido oleico o ácido linoleico .....	93
<b>Figura 27.</b> Efecto de los inhibidores de MAPKs y de JAK sobre la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 y sobre la expresión de ARNm de CCL2 inducida por ácido oleico o ácido linoleico .....	94
<b>Figura 28.</b> Efecto del agonista de PPAR $\gamma$ sobre la activación de MAPKs y JAK inducida por ácido oleico o ácido linoleico .....	95
<b>Figura 29.</b> Efecto del agonista de PPAR $\gamma$ sobre la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 y la expresión de ARNm de CCL2 inducida por ácido oleico o ácido linoleico .....	96
<b>Figura 30.</b> Lactato deshidrogenasa liberada en respuesta a ácido araquidónico .....	97
<b>Figura 31.</b> Expresión de ARNm de CCL2, P-selectina, TLR4 y PPAR $\gamma$ en respuesta a ácido araquidónico .....	98

<b>Figura 32.</b> Producción de prostaglandina E2 y tromboxano B2 en respuesta a ácido araquidónico. Efectos de los inhibidores de ciclooxigenasa-2, TLR4 o del agonista de PPAR $\gamma$ .....	98
<b>Figura 33.</b> Efecto del inhibidor de ciclooxigenasa-2 sobre la expresión de ARNm de CCL2, P-selectina, TLR4 y PPAR $\gamma$ en respuesta a ácido araquidónico .....	99
<b>Figura 34.</b> Formas fosforiladas de las MAPKs y JAK y activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 en respuesta a ácido araquidónico .....	100
<b>Figura 35.</b> Efecto de los inhibidores de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 sobre la expresión de ARNm de CCL2 en respuesta a ácido araquidónico .....	101
<b>Figura 36.</b> Efecto de los inhibidores de las MAPKs y JAK sobre la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 y sobre la expresión de ARNm de CCL2 en respuesta a ácido araquidónico .....	102
<b>Figura 37.</b> Efecto del inhibidor de TLR4 y del agonista de PPAR $\gamma$ sobre la fosforilación de las MAPKs y JAK en respuesta a ácido araquidónico .....	103
<b>Figura 38.</b> Efecto del inhibidor de TLR4 y del agonista de PPAR $\gamma$ sobre la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 en respuesta a ácido araquidónico .....	104
<b>Figura 39.</b> Efecto del inhibidor de TLR4 y del agonista de PPAR $\gamma$ sobre la expresión de ARNm de CCL2 y P-selectina en respuesta a ácido araquidónico .....	105
<b>Figura 40.</b> Efecto del agonista de PPAR $\gamma$ sobre la expresión de ARNm y de proteína de TLR4 y efecto del inhibidor de TLR4 sobre la expresión de ARNm y de proteína de PPAR $\gamma$ en respuesta a ácido araquidónico .....	106
<b>Figura 41.</b> Lactato deshidrogenasa liberada al medio en respuesta a POPC o POPC oxidado .....	107
<b>Figura 42.</b> Expresión de ARNm de CCL2, TLR4 y PPAR $\gamma$ en respuesta a POPC o POPC oxidado en acinos control o acinos incubados con taurocolato sódico .....	108
<b>Figura 43.</b> Formas fosforiladas de JNK y JAK en respuesta a POPC o POPC oxidado en acinos control o acinos incubados con taurocolato sódico .....	109
<b>Figura 44.</b> Activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 en respuesta a POPC o POPC oxidado en acinos control o acinos incubados con taurocolato sódico .....	110
<b>Figura 45.</b> Efecto del inhibidor de TLR4 sobre la fosforilación de JNK-MAPK y JAK en acinos control en respuesta a POPC oxidado .....	111
<b>Figura 46.</b> Efecto de los inhibidores de JNK, JAK, NF- $\kappa$ B, STAT3 o TLR4 sobre la expresión de ARNm de CCL2 en acinos control en respuesta a POPC oxidado .....	112
<b>Figura 47.</b> Efecto de los inhibidores de JNK, JAK y TLR4 sobre la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 en la respuesta de acinos control a POPC oxidado .....	113
<b>Figura 48.</b> Efecto del antagonista de PPAR $\gamma$ sobre la expresión de ARNm de CCL2 y de TLR4 en acinos estimulados con taurocolato sódico tratados con POPC o POPC oxidado .....	114



**Figura 49.** Parámetros de diagnóstico de ratas con pancreatitis aguda inducida por obstrucción biliopancreática, tratadas y no tratadas con el inhibidor de TLR4 o con el agonista de PPAR $\gamma$  ..... 115



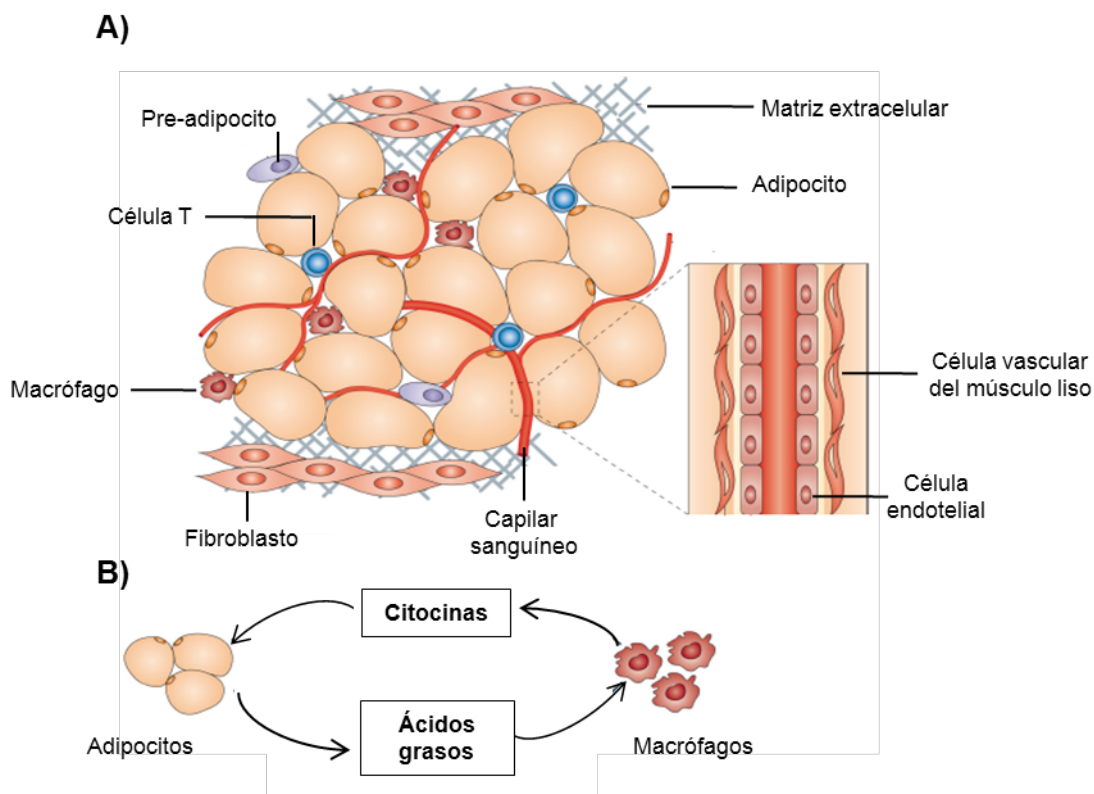
## I. INTRODUCCIÓN



## 1. TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es un tejido conectivo que actúa como reservorio de sustratos metabólicos para obtener energía, aislante térmico y como amortiguador mecánico. Existen dos tipos de tejido adiposo: el tejido adiposo marrón (o pardo) y el tejido adiposo blanco. El primero de ellos tiene un papel importante en la termogénesis en los recién nacidos, pero está reducido en los adultos, mientras que en los humanos adultos predomina el tejido adiposo blanco. En el hombre adulto en estado de salud, el tejido adiposo supone un 21% de la masa corporal (Snyder *et al.*, 1975), y puede ser dividido en dos compartimentos principales, el depósito subcutáneo y el visceral. La grasa en forma de triglicéridos (TGs) se almacena como reserva energética preferentemente en el tejido adiposo, representando cerca del 80% del mismo, mientras que el 20% restante está compuesto principalmente por agua, proteínas y minerales (Fuller *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 1992).

El tejido adiposo está constituido por adipocitos, como unidades funcionales y otros tipos celulares, tales como pre-adipocitos, fibroblastos, células endoteliales vasculares y una gran variedad de células inmunes, entre las que se encuentran mastocitos, eosinófilos, células B, células T y macrófagos (Schipper *et al.*, 2012) (Figura 1A). Entre los leucocitos, los macrófagos son los más abundantes, alcanzando valores de casi el 50% en ratones e individuos obesos comparado con el 10% encontrado en ratones de fenotipo delgado e individuos con un índice de masa corporal normal (Weisberg *et al.*, 2003). La elevada infiltración de macrófagos en tejido adiposo de individuos obesos se correlaciona actualmente con la alta producción de moléculas proinflamatorias liberadas desde tejido adiposo (Tilg y Moschen, 2008) y se contrapone con la idea tradicionalmente barajada de que los adipocitos eran la única fuente de mediadores inflamatorios en el tejido adiposo. En base a esto, se defiende la existencia de una comunicación bidireccional entre los adipocitos y los macrófagos para propagar la inflamación, estableciéndose un círculo vicioso a través de un “loop” paracrino que involucra a ácidos grasos (AGs) y citocinas inflamatorias (Suganami *et al.*, 2005) (Figura 1B).



**Figura 1. A) Componentes del tejido adiposo. B) Ejemplo de comunicación intercelular entre células del tejido adiposo.** (Adaptado de Ouchi N., *et al.*, 2011. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 85-97).

El elemento constitutivo básico de los adipocitos es el contenido lipídico, compuesto principalmente por TGs y colesterol, y agrupado en gotas lipídicas. El tejido adiposo blanco está constituido por tejido unilocular, en el que cada adipocito contiene una sola gota lipídica ocupando el 90% del volumen celular y desplazando los orgánulos citoplasmáticos hacia la periferia (Suzuki *et al.*, 2011, Yu *et al.*, 2010) .

Tanto la diferenciación de los adipocitos como la generación y mantenimiento de las gotas lipídicas está regulado por lipinas (Peterfy *et al.*, 2005, Valdearcos *et al.*, 2011), una familia de proteínas con actividad fosfatasa, encargada de la hidrólisis del ácido fosfatídico para producir diacilglicerol (DAG), precursor de TGs, que es la forma en que se acumulan los lípidos neutros en el adipocito como reserva energética. Además, las moléculas de DAGs generadas por lipinas, pueden ser utilizadas para la síntesis de los principales fosfolípidos (FLs) de membrana (Weiss *et al.*, 1958). Recientemente, además de su papel metabólico, se ha reconocido para la lipina un papel regulador en los procesos inmunes, actuando como moléculas de comunicación entre el metabolismo lipídico y la inflamación. Valdearcos *et al.* (2012)

demonstraron que la capacidad de los macrófagos para almacenar TGs se correlaciona inversamente con la expresión de genes proinflamatorios y concluyeron que la lipina-2 es el miembro de la familia de las lipinas responsable de inhibir rutas de señalización proinflamatorias en macrófagos.

En el tejido adiposo, adipocitos y otros tipos celulares contribuyen a la liberación de metabolitos como citocinas, quimiocinas o péptidos bioactivos llamados “adipocinas” (Fantuzzi, 2005, Kershaw y Flier, 2004). Estas adipocinas actúan a nivel sistémico en órganos diana, incluyendo el cerebro, hígado, músculo, vasculatura, corazón, páncreas o sistema inmune (Blüher, 2014, Blüher y Mantzoros, 2015), donde ejercen acciones específicas sobre procesos tales como: respuesta inflamatoria, metabolismo de glucosa, presión sanguínea, contractilidad del miocardio, adhesión celular, función y crecimiento vascular, adipogénesis y morfogénesis ósea o regulación del apetito y saciedad (Blüher, 2014). Por lo tanto, alteraciones en la secreción de adipocinas podrían vincular la obesidad a sus consecuencias fisiopatológicas y comorbilidad (Blüher y Mantzoros, 2015).

## **2. COMPOSICIÓN DE LA GRASA**

Al hablar de grasa, suele utilizarse el término lípidos (del griego *lipos*, grasa), que son sustancias de origen biológico solubles en disolventes orgánicos, tales como el cloroformo, pero insolubles en agua.

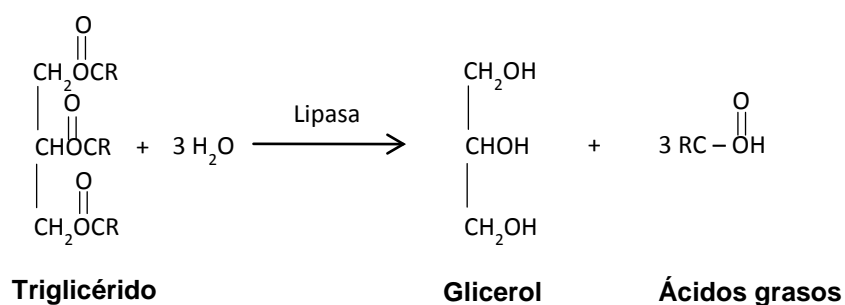
Los lípidos son moléculas biológicamente activas cuya actividad depende de su estructura y propiedades químicas. Los compuestos lipídicos más abundantes son: triglicéridos (TGs), ácidos grasos (AGs) y fosfolípidos (FLs).

### **2.1. Triglicéridos**

Los triglicéridos o triacilgliceroles son triésteres de AGs de glicerol, con naturaleza apolar. A pesar de no ser componentes de membranas biológicas, son la clase de lípidos más abundantes en el organismo como componente principal de la grasa corporal (Wang *et al.*, 1992).

En el organismo, estos compuestos son susceptibles a la acción enzimática de las lipasas, que catalizan su hidrólisis con la subsecuente generación de AGs que se liberan a la circulación. Se han descrito diferentes lipasas responsables de la

hidrólisis de TGs intracelulares: lipasa sensible a hormona (LSH), lipasa adiposa de TGs (ATGL), monoacilglicerol lipasa (MAGL), lipasa ácida lisosomal (LAL) y carboxil esterasa 3/triglicérido hidrolasa (Ces3/TGH) (Papackova y Cahova, 2015). La LSH fue la primera y mejor caracterizada enzima implicada en la hidrólisis de TGs (Holm *et al.*, 1988). Esta enzima está altamente expresada en adipocitos, y ejerce su acción sobre TGs, DAGs, colesterol y ésteres de retinol (Fredrikson *et al.*, 1981, Pittman *et al.*, 1975, Wei *et al.*, 1997). Además, la TG lipasa (Zimmermann *et al.*, 2004) cataliza la hidrólisis de TGs a DAGs liberando AGs. Por último, la MAGL, por hidrolizar monoacilgliceroles, también contribuye a la liberación de AGs (Yang *et al.*, 2010).



Por otra parte, merece la pena reseñar en este trabajo que la digestión duodenal de los lípidos de la dieta en mamíferos depende de la acción de las lipasas pancreáticas, de las que se han descrito cuatro tipos diferentes en células acinares pancreáticas: lipasa de TGs pancreática, lipasa carboxil esterasa, y proteínas similares a lipasas pancreáticas 1 y 2 (Lowe, 2002). Para su correcta funcionalidad, estas lipasas requieren de la colipasa pancreática como cofactor, y de sales biliares.

## 2.2. Ácidos grasos

Los AGs son cadenas hidrocarbonadas con un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el otro. Raramente se encuentran libres en la naturaleza sino más bien esterificados como componentes mayoritarios de otros lípidos. En la Tabla 1 se recogen los AGs más comunes en la naturaleza. Tanto en las plantas superiores como en animales, los AGs predominantes son los de las especies de 16 y 18 carbonos (por ejemplo, palmítico, esteárico, oleico y linoleico), mientras que aquellos AGs con menos de 14 o más de 20 átomos de carbono son muy poco abundantes. La mayor parte de los AGs tienen un número par de átomos de carbono debido a que normalmente se sintetizan por concatenación de unidades de dos átomos de carbono. Aquellos AGs que no contienen ningún doble enlace en su molécula se



llaman AGs saturados, mientras que los que presentan algún doble enlace se conocen como AGs insaturados, pudiendo contener, estos últimos, un único doble enlace (AGs monoinsaturados), o más de uno (AGs poliinsaturados).

En los AGs poliinsaturados, los dobles enlaces tienden a encontrarse a intervalos de tres carbonos en dirección al metilo terminal de la molécula y, por esta razón, nunca se hallan conjugados. Se clasifican generalmente en n3, n6 y n9 (también llamados omega-3, omega-6, y omega-9 respectivamente) en función de la localización del último doble enlace respecto al residuo metilo-terminal de la molécula. Como el metabolismo de AGs n3 y n6 comparte muchas enzimas, existe una competición entre ambas familias de AGs, de forma que el exceso de un tipo de estos AGs provoca un descenso en el otro grupo.

Algunos AG poliinsaturados n3 y n6 no pueden ser sintetizados *de novo* en células de mamíferos, por lo que deben ser obtenidos de la dieta, y son los que se conocen como AGs esenciales (Lopez-Vicario *et al.*, 2015, Simopoulos, 1999), o también conocidos como Vitamina F. En animales, los AGs esenciales son el ácido linoleico, el ácido  $\alpha$ -linolénico y el ácido araquidónico.

La composición lipídica del tejido adiposo depende fundamentalmente de la dieta. Así, las diferencias que existen en la composición del tejido adiposo entre diferentes razas, edades y géneros desaparecen cuando se consume una dieta cuya composición de AGs es similar (Field *et al.*, 1985).

**Tabla 1. Ácidos grasos más comunes**

Símbolo	Nombre común	Nombre sistemático	Estructura
<b>Ácidos grasos saturados</b>			
12:0	Ac. láurico	Ac. dodecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14:0	Ac. mirístico	Ac. tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16:0	Ac. palmítico	Ac. hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18:0	Ac. esteárico	Ac. octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
20:0	Ac. araquídico	Ac. eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
22:0	Ac. behénico	Ac. docosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
24:0	Ac. lignocérico	Ac. tetracosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
<b>Ácidos grasos insaturados</b>			
16:1 (n7)	Ac. palmitoleico	Ac. 9-hexadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:1 (n9)	Ac. oleico	Ac. 9-octadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:2 (n6)	Ac. linoleico	Ac. 9,12-octadecadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3 (n3)	Ac. $\alpha$ -linolénico	Ac. 9,12,15-octadecatrienoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3 (n6)	Ac. $\gamma$ -linolénico	Ac. 6,9,12-octadecatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
20:1 (n9)	Ac. gadoleico	Ac. 11-eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
20:2 (n6)	Ac. eicosadienoicos	Ac. 11-14-eicosadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
20:3 (n6)	Ac. dihomo-gamma-linolénico	Ac. 8,11,14-eicosatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$
20:4 (n6)	Ac. araquidónico	Ac. 5,8,11,14-eicosatetraenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
20:5 (n3)	Ac. eicosapentaenoico	Ac. 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
22:4 (n6)	Ac. adrénico	Ac. 7,10,13,16-docosatetraenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
22:6 (n3)	Ac. docosahexaenoico	Ac. 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_6\text{CH}_2\text{COOH}$
24:1 (n9)	Ac. nervónico	Ac. 15-tetracosenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$

En la mayoría de las dietas occidentales el ácido linoleico y el  $\alpha$ -linolénico constituyen entre el 95-98% de la ingesta de AG poliinsaturados (Calder y Burdge, 2004). El consumo de ácido linoleico y otros n6 en países occidentales aumentó considerablemente en la segunda mitad del siglo XX, tras la introducción y comercialización de aceites y margarinas de cocina, produciéndose una elevada ingesta de aceites vegetales de cereales, soja y semillas de girasol y algodón, productos que contienen grandes cantidades de AG poliinsaturados n6 pero no n3 (Yu *et al.*, 2013), con el consiguiente incremento de la proporción entre AGs poliinsaturados n6/n3 en la dieta (Burdge y Calder, 2006, Calder y Burdge, 2004). En la población española, considerando el conjunto de hombres y mujeres, la proporción de ácido linoleico:ácido  $\alpha$ -linolénico es de 27:0 (Burdge y Calder, 2006), aunque hay una tendencia a sugerir un mayor consumo de n3 para revertir en la medida de lo posible estas proporciones. En base a diversos estudios llevados a cabo en los

últimos 20 años, se ha concluido que una elevada proporción de AGs poliinsaturados n6/n3 puede contribuir a la elevada prevalencia en la sociedad occidental de patologías, tales como enfermedades cardíacas, alteraciones autoinmunes y depresión (Simopoulos, 2008a).

Una vez liberados de los adipocitos, los AGs son rápidamente ionizados en el plasma, y la parte iónica se combina con la albúmina plasmática para su transporte hacia tejidos periféricos. En condiciones fisiológicas, los AGs se unen a albúmina en un ratio molar AGs-albúmina entre 0,5 y 4, siendo lo más frecuente en humanos entre 0,5 y 1,5 (Court *et al.*, 1971). De esta manera se facilita su transporte hasta los hepatocitos y la consiguiente depuración hepática. Cuando los complejos AG:albúmina interactúan con superficies celulares, se disocian para que los AGs puedan ser captados por la célula, un proceso en el que están implicadas proteínas de membrana con una alta afinidad para los AGs, entre las cuales se hallan la translocasa de AGs (FAT, también llamada CD36), la proteína de unión a AGs asociada a membrana (FABPpm) y, al menos, seis proteínas transportadoras de AGs (FATPs) (Koonen *et al.*, 2005).

En los complejos AGs-albúmina la solubilidad de los AGs es efectiva cuando la concentración no supere  $2 \times 10^{-3}$  M (Voet *et al.*, 2007). En ausencia de albúmina, los AGs reducen su solubilidad en sangre hasta concentraciones no superiores a  $10^{-6}$  M. Por encima de esta concentración resultan tóxicos, ya que forman micelas que actúan como detergentes alterando la estructura de las membranas celulares. Los AGs también son tóxicos en el interior de la célula, por lo que deben ser rápidamente convertidos a derivados lipídicos, mediante la acción de enzimas, entre las que se hallan lipooxigenasas (LOXs) y ciclooxigenasas (COXs).

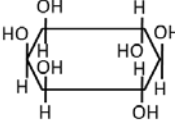
Los AGs, además de ser una fuente importante de energía, son elementos importantes en el funcionamiento celular, manteniendo la fluidez de la membrana y su estructura molecular, de la cual dependen mecanismos de señalización celular para la expresión de genes implicados en otras funciones biológicas (Calder y Burdge, 2004).

### 2.3. Fosfolípidos

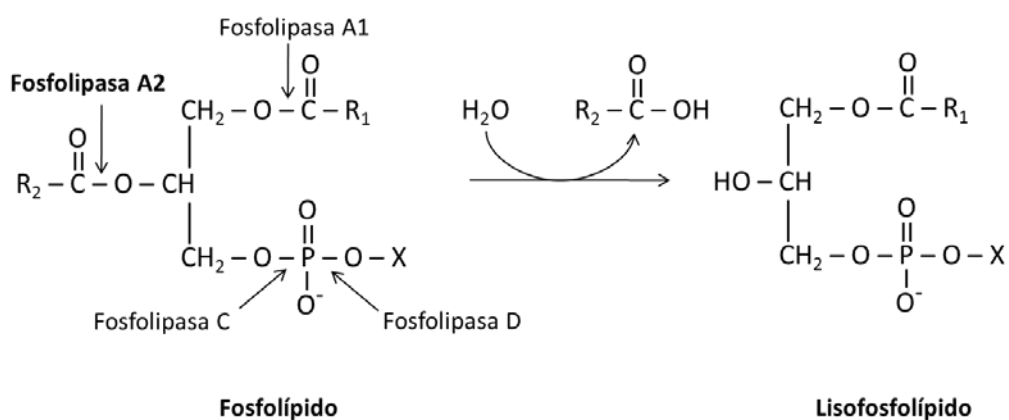
Los fosfolípidos, que incluyen glicerofosfolípidos y esfingofosfolípidos, son la clase más abundante de lípidos polares, y se encuentran mayoritariamente en las membranas celulares y en la cara externa de lipoproteínas. Los glicerofosfolípidos son la subclase de FLs más abundante, y están compuestos por *sn*-glicerol-3-fosfato esterificado en sus posiciones C1 y C2 con AGs y en su C3 con un residuo de ácido fosfórico al cual se une uno de los siguientes grupos polares: colina, etanolamina, serina, inositol o glicerol (Mann y Skeaff, 1998). En la Tabla 2 se recogen los glicerofosfolípidos más abundantes. Los FLs son, por tanto, moléculas anfipáticas con “colas” apolares alifáticas de ácidos grasos y “cabezas” fosforilo-X polares. Dentro de los glicerofosfolípidos, la mayoría de los tejidos de mamíferos presentan fosfatidilcolina como cabeza polar, mientras que en otros tejidos como el cerebro están muy representadas la fosfatidiletanolamina o fosfatidilserina, las cuales representan subclases menos abundantes de FLs (Vance, 2008).

La composición de los FLs en las membranas biológicas no es homogénea, sino que es específica de cada tejido y tipo celular (van Meer *et al.*, 2008, Yamashita *et al.*, 1997). En la posición C1 de los FLs generalmente se hallan AGs saturados de entre 16 y 18 átomos de carbono, mientras que la posición C2 suele estar ocupada por un AG insaturado de entre 16 y 20 carbonos. El ácido araquidónico forma parte de los FLs de membrana, especialmente en la posición C2 de fosfatidilinositol y/o fosfatidilcolina. La nomenclatura de los FLs atiende a las identidades de estos restos de ácidos grasos seguido de la cabeza polar que se une al ácido fosfórico. No obstante, algunos FLs se agrupan en familias con nombres genéricos como por ejemplo, las fosfatidilcolinas, conocidas también como lecitinas, o las fosfatidiletanolaminas como cefalinas.

Tabla 2. Glicerofosfolípidos más comunes

Nombre de X - OH	Fórmula de - X	Nombre del fosfolípido
Agua	- H	Ácido fosfatídico
Etanolamina	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Fofatidiletanolamina
Colina	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Fosfatidilcolina
Serina	- CH <sub>2</sub> CH(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )COO <sup>-</sup>	Fosfatidilserina
<i>mio</i> -Inositol		Fosfatidilinositol
Glicerol	- CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	Fosfatidilglicerol

Los FLs son susceptibles de ser atacados enzimáticamente por las fosfolipasas, las cuales hidrolizan los enlaces éster presentes en su molécula. Esta familia de enzimas se clasifica en función del enlace éster que escinden, estableciéndose cuatro tipos: fosfolipasas A1, A2, C y D. La acción bioquímica de las fosfolipasas sobre los glicerofosfolípidos de membrana da lugar a AGs y lisofosfolípidos. Si tomamos como ejemplo la fosfolipasa A2 (PLA2), que se ha visto significativamente implicada en patologías como la pancreatitis aguda (PA) (Scheele, 1987), el resultado es el que se muestra en el siguiente esquema:



### 3. INFLUENCIA DEL TEJIDO ADIPOSO EN PROCESOS INFLAMATORIOS

El tejido adiposo se ha considerado durante mucho tiempo como un mero reservorio de sustratos energéticos. Sin embargo, el descubrimiento de la leptina en 1994 y la siguiente identificación de otras adipocinas (adiponectina, resistina, omentina, visfatina, quemerina, etc.), así como de quimiocinas y citocinas (Kadowaki *et al.*, 2006) liberadas desde tejido adiposo ha cambiado el concepto tradicional referido a su actividad biológica. Actualmente está ampliamente aceptado que el tejido adiposo es un tejido dinámico, que actúa como un órgano endocrino activo participando en la regulación de varios procesos fisiológicos. Es importante destacar el papel que juega el tejido adiposo en procesos inflamatorios, mediado por la liberación de moléculas biológicamente activas de distinta naturaleza (proteica y lipídica) que alteran la respuesta inmune. El tejido graso podría promover la inflamación sistémica a través de tres mecanismos principales: secreción de factores que estimulan la síntesis de mediadores inflamatorios en otros tejidos, secreción de factores inflamatorios propiamente dichos y lipotoxicidad (Lago *et al.*, 2007). Además, la inflamación también podría deberse a una reducción de mediadores antiinflamatorios. En base a ello, se asume su implicación en diversas patologías en las que subyace una respuesta inflamatoria, tales como diabetes tipo II, enfermedades intestinales, esclerosis múltiple o artritis reumatoide, entre otras, en las que se ha comprobado una alteración en los niveles locales y/o sistémicos de adipocinas (Fantuzzi, 2005), citocinas (Cottam *et al.*, 2004) o lípidos (Khan *et al.*, 2012, Snel *et al.*, 2012).

#### 3.1. Acción de compuestos proteicos

##### 3.1.1. Adipocinas

Actualmente se sabe de la existencia de una larga lista de adipocinas liberadas del tejido adiposo blanco, a las que mayoritariamente se les ha atribuido un papel metabólico. Sin embargo, podríamos reseñar tres adipocinas (leptina, resistina y adiponectina), que además de sus efectos en el metabolismo, han demostrado estar implicadas en respuestas inflamatorias. La leptina es un péptido de 16 kDa que, además de su papel en la regulación de ingesta de alimentos y el aumento en el consumo de energía, también es ampliamente considerada como una molécula proinflamatoria (Fantuzzi y Faggioni, 2000). Tiene similitudes estructurales con la interleucina-6 (IL-6) y se une a un receptor de membrana, actuando como una

citocina en diferentes enfermedades inflamatorias tales como lupus eritematoso sistémico (Xu *et al.*, 2014), artritis reumatoide (Bokarewa *et al.*, 2003), esclerosis múltiple (Matarese *et al.*, 2010) o psoriasis (Aly *et al.*, 2013). Entre sus efectos proinflamatorios cabe destacar la quimiotaxis de neutrófilos, la maduración de células dendríticas, el incremento en la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-6 o IL-12 (Loffreda *et al.*, 1998) y la activación de monocitos y macrófagos con la consiguiente inducción de la expresión de marcadores de superficie (CD69, CD25, CD38, CD71) y moléculas de adhesión (Vadacca *et al.*, 2011, Zarkesh-Esfahani *et al.*, 2001). A pesar de sus efectos proinflamatorios bien reconocidos, la leptina también ha demostrado ejercer efectos antiinflamatorios, mediante la estimulación de la producción del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Madiehe *et al.*, 2003). También la resistina, péptido de 12 kDa, es una adipocina que, además de inducir resistencia a la acción de la insulina, ha demostrado efectos proinflamatorios aumentando en células endoteliales la expresión de moléculas de adhesión (VCAM) y quimiocinas (CCL2) (Verma *et al.*, 2003).

Por el contrario, la adiponectina es un péptido de 30 kDa que, además de sus efectos metabólicos aumentando la sensibilidad a la insulina y la oxidación de los ácidos grasos, posee propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas (Stofkova, 2009), considerándose como una adipocina cardioprotectora (Villarreal-Molina y Antuna-Puente, 2012). En varios tipos celulares, sus efectos se han puesto de manifiesto en una inhibición de la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, E-selectina, ICAM-1) y de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ), así como en una reducción de la expresión de "scavenger receptors" (Stofkova, 2009, Tsatsanis *et al.*, 2005). Además, esta adipocina induce la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Villarreal-Molina y Antuna-Puente, 2012) y potencia la actividad de la ruta operada por el receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2) (Baeuerle y Baltimore, 1996, Wulster-Radcliffe *et al.*, 2004), inhibiendo así mecanismos proinflamatorios. No obstante, en contraste con su acción mayoritariamente antiinflamatoria, también se ha descrito la implicación de la adiponectina en procesos inflamatorios crónicos, perpetuando el daño tisular (Ehling *et al.*, 2006, Tang *et al.*, 2007).

### 3.1.2. Citocinas

Además de adipocinas, desde el tejido adiposo también se liberan citocinas, que mayoritariamente son de carácter proinflamatorio, como IL-1 $\beta$ , IL-6 o TNF $\alpha$ . Estas citocinas se liberan de adipocitos y, principalmente, de macrófagos infiltrados, siendo el tejido adiposo de las áreas epididimal y mesentérica las que presentan una mayor expresión de IL-1 $\beta$  durante PA experimental (Gea-Sorli *et al.*, 2012). Estas moléculas se han visto implicadas en alteraciones fisiológicas tales como un aumento de la resistencia a insulina o una mayor susceptibilidad a asma (Fantuzzi, 2005). También se ha descrito la liberación de quimiocinas desde el tejido adiposo, entre las que se encuentran CCL2 y la proteína inflamatoria de macrófagos-1 (MIP-1) (Fantuzzi, 2005), ambas con efectos proinflamatorios.

No obstante, a pesar de estar relacionado mayoritariamente con patologías en las que se manifiestan efectos inflamatorios, el tejido adiposo también es capaz de producir citocinas antiinflamatorias como IL-10 e IL-1Ra (Tracy, 2001).

### 3.2. Acción de compuestos lipídicos

Desde el tejido adiposo también se liberan moléculas de naturaleza lipídica, con efectos específicos sobre la respuesta inflamatoria.

#### 3.2.1. Ácidos grasos

Se liberan gran cantidad de **AGs** como resultado de la lipólisis ocurrida por un aumento de la acción enzimática de las lipasas y fosfolipasas y/o por la acción de citocinas liberadas por macrófagos infiltrados (Snel *et al.*, 2012, Suganami y Ogawa, 2010). Estos AGs afectan tanto al metabolismo como a la estructura y función celular.

Los **AGs** liberados en exceso a la circulación promueven un almacenamiento ectópico de lípidos que induce una resistencia a la insulina en músculo e hígado, desencadenante de alteraciones metabólicas asociadas a obesidad y diabetes tipo 2 (Snel *et al.*, 2012). Esta acumulación de grasa ectópica está regulada por proteínas entre las que se encuentran las lipinas (Reue y Zhang, 2008).

Los AGs también ejercen efectos citotóxicos directos, entre los que se han descrito la inducción de la peroxidación de otros lípidos de membrana (Morita *et al.*, 1998), la producción de EROs (Lee *et al.*, 2006), la alteración de la homeostasis del



calcio intracelular (Navina *et al.*, 2011, Toborek *et al.*, 1996), la depleción de los niveles de ATP intracelulares (Navina *et al.*, 2011) y el daño mitocondrial detectado tanto por un aumento de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), indicador de necrosis celular (Morita *et al.*, 1998, Noel *et al.*, 2014), como por la inhibición de los complejos mitocondriales I y V (Navina *et al.*, 2011). Además, los AGs pueden afectar a la integridad celular al actuar como detergentes sobre la estructura lipoproteica de la membrana (Lee y Howard, 1979).

Los efectos citotóxicos de los AGs también pueden resultar de una acción indirecta a través de la generación de mediadores inflamatorios como  $\text{TNF}\alpha$ , CCL2 o IL-6, los cuales pueden exacerbar, de forma independiente, el daño local y sistémico (Navina *et al.*, 2011).

Se han descrito distintos mecanismos para explicar la acción de los AGs sobre los procesos inflamatorios: (1) actuando directamente mediante receptores de AGs de superficie o intracelulares, (2) incorporándose a los FLs de membrana de células inflamatorias, alterando así la fluidez de la misma e influyendo en la formación de “rafts” o balsas lipídicas, que resulta en una modificación de las cascadas de señalización intracelulares iniciadas desde la membrana, y (3) actuando como precursores de moléculas de señalización extracelulares como las prostaglandinas (Calder, 2012).

En relación con la inflamación, se han descrito efectos pro y antiinflamatorios, así como ningún efecto para los AGs, dependiendo de su estructura química y del tipo celular sobre el que actúan (Volpe y Nogueira-Machado, 2013).

Respecto a los **AGs saturados**, en base a las referencias bibliográficas existentes, predomina la idea de que en la mayoría de los casos ejercen efectos proinflamatorios. Se ha descrito un aumento de producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y  $\text{TNF}\alpha$  en respuesta a ácido palmítico, ácido láurico y ácido esteárico en células dendríticas y astrocitos (Gupta *et al.*, 2012, Weatherill *et al.*, 2005), una activación de NADPH oxidasas en macrófagos en respuesta a ácido láurico (Wong *et al.*, 2009), así como un aumento en la expresión de genes como IP-10, IL-8, CCL2 o COX-2 en macrófagos estimulados con ácido palmítico (Laine *et al.*, 2007). Los AGs saturados han demostrado interactuar con TLR4 y TLR2, iniciando así una cascada de señalización intracelular que activa proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y los factores los factores de

transcripción NF- $\kappa$ B (factor nuclear *kappa* B) y AP-1 (proteína activadora-1) (Hambleton *et al.*, 1996, Mackman *et al.*, 1991, Nguyen *et al.*, 2007, Weinstein *et al.*, 1992). También interactúan con receptores acoplados a proteínas G (Volpe y Nogueira-Machado, 2013) que, mediado por la proteína cinasa C (PKC), activan NF- $\kappa$ B estimulando así la expresión de citocinas proinflamatorias .

Sin embargo, Navina *et al.* (2011) no observaron ningún efecto en la respuesta inflamatoria de células acinares pancreáticas incubadas con ácido palmítico. Respecto a los AGs saturados, no se han encontrado referencias bibliográficas que describan efectos antiinflamatorios.

En cuanto a los **AGs insaturados**, se ha considerado de forma generalizada que son los AG n6 y n3 los que juegan un papel primordial en la respuesta inflamatoria, ejerciendo en la mayoría de los casos funciones opuestas (Calder, 2009). Hay una amplia tendencia a considerar que los n3 ejercen efectos antiinflamatorios, una consideración extraída de diversos estudios llevados a cabo en diferentes tipos celulares (macrófagos, células dendríticas, células endoteliales de glomérulo renal, células mesangiales y adipocitos, entre otras). Los ácidos grasos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) ha demostrado reducir la producción de interleucinas (IL-6, IL-8), CCL2 o prostaglandina E2 (PGE2) (Babcock *et al.*, 2002), como consecuencia de la alteración de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Chaudhary *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2001, Siriwardhana *et al.*, 2012). Kong *et al.* (2010) demostraron, en células dendríticas, una reducción de la producción de mediadores inflamatorios en respuesta a DHA como resultado de la activación de PPAR $\gamma$ , que a su vez bloquea la activación de NF- $\kappa$ B. Asimismo, se ha descrito en línea celular de macrófagos que el efecto antiinflamatorio de DHA es mediado por una inhibición de TLR4 (Lee *et al.*, 2004). Por otra parte, AGs n3 se consideran beneficiosos para reducir la inflamación por actuar como precursores de resolvinas y protectinas (Serhan, 2007), mediadores lipídicos endógenos implicados en la resolución de la inflamación, al inhibir el reclutamiento de neutrófilos, reprimir la expresión de citocinas y quimiocinas o antagonizar la respuesta quimiotáctica inducida por leucotrieno B4 (LTB4) (Im, 2012, Ishida *et al.*, 2010, Schwab *et al.*, 2007).

Además de los resultados experimentales obtenidos para analizar *in vitro* la respuesta celular a AGs individuales, diversos estudios llevados a cabo tanto en

modelos animales como en humanos han mostrado que los AGs poliinsaturados n3 de la dieta ejercen efectos beneficiosos en enfermedades inflamatorias del tracto intestinal. Tales efectos cursan con una acción inhibitoria sobre la producción de citocinas y eicosanoides inflamatorios, así como con un efecto estimulante de la producción de moléculas antiinflamatorias como resolvinas y protectinas (Calder, 2008, 2009, 2011). También, AGs n3 han resultado ser eficaces para reducir el progreso de la aterosclerosis (Calder y Yaqoob, 2010) y la mortalidad asociada a enfermedades cardiovasculares (Bucher *et al.*, 2002). A pesar de que la mayoría de los estudios sugieren que la administración de AGs n3 en la dieta resulta beneficiosa por su acción antiinflamatoria, hay estudios que no confirman esta hipótesis. Thien *et al.* (2011), tras una revisión de estudios clínicos enfocados al análisis del consumo de n3 en relación con la inflamación asociada a asma y función pulmonar, concluyeron que no había evidencias claras que mostraran efectos beneficiosos de la administración de este tipo de AGs en estas condiciones patológicas. No obstante, es importante señalar que no se ha encontrado bibliografía que describa efectos nocivos de AGs n3 en la respuesta inflamatoria.

Respecto a los AGs n6 y a los AGs monoinsaturados, se han aportado mayor número de resultados experimentales que indican efectos proinflamatorios. No obstante, es en estos tipos de AGs donde existe mayor controversia.

Para el ácido oleico se ha descrito un efecto proinflamatorio en células del epitelio pigmentario de la retina (Fang *et al.*, 2009), aumentando la expresión de genes inflamatorios tales como COX-2 e iNOS mediada por la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Además, se ha descrito que la administración intravenosa de ácido oleico produce un aumento en la actividad mieloperoxidasa (MPO) y en la producción de TNF $\alpha$  en tejido pulmonar (Ito *et al.*, 2005), así como una rápida migración de leucocitos polimorfonucleares hacia el fluido bronqueoalveolar, produciendo daño pulmonar (Hussain *et al.*, 1998) similar a la inflamación aguda observada en el síndrome de disfunción respiratoria del adulto (Dickey *et al.*, 1981). Por el contrario, Toborek *et al.* (2002) demostraron para el ácido oleico efectos antiinflamatorios en células endoteliales. En otro estudio llevado a cabo en astrocitos, el ácido oleico no indujo ningún cambio en la producción de citocinas proinflamatorias (Gupta *et al.*, 2012).

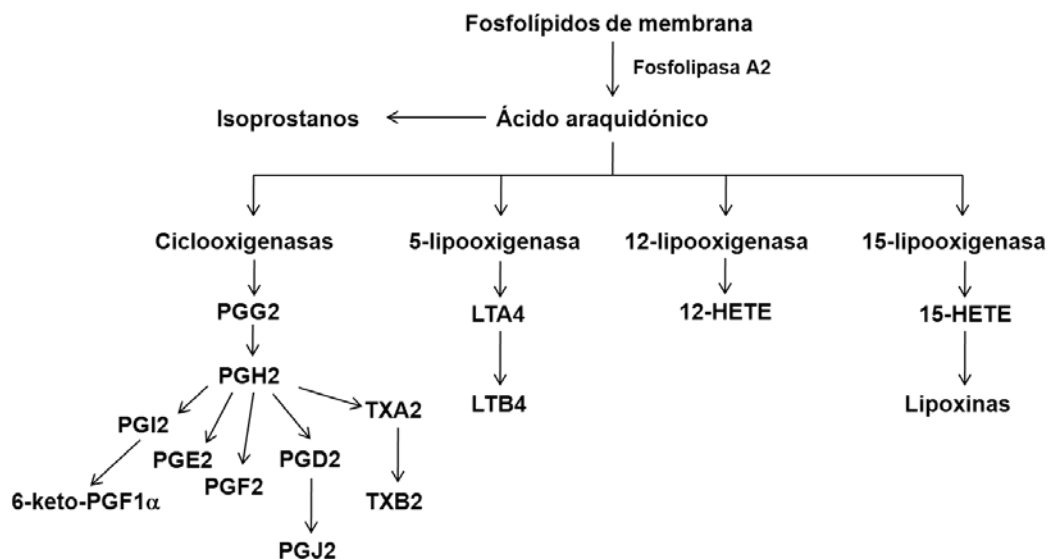
Diferentes estudios llevados a cabo con ácido linoleico, otro AG insaturado altamente representado en la composición de la grasa visceral, han revelado un aumento en la expresión y/o producción de mediadores inflamatorios como CCL2, IL-6, TNF $\alpha$ , ICAM-1 o VCAM-1 mediada por la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y/o AP-1 en células endoteliales (Hennig *et al.*, 2006, Hennig *et al.*, 1996, Toborek *et al.*, 2002), células del epitelio pigmentario de la retina (Fang *et al.*, 2009) y adipocitos (Siriwardhana *et al.*, 2012). En la misma línea, Navina *et al.* (2011) demostraron que el ácido linoleico aumenta la expresión de mediadores inflamatorios, como TNF $\alpha$ , CXCL1 o CXCL2, en células acinares pancreáticas. En el estudio llevado a cabo por Magdalon *et al.* (2012), el ácido linoleico incrementó la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS), mientras que redujo la producción de IL-6 en ausencia de LPS. En el mismo trabajo, el ácido linoleico no ejerció ningún efecto en la producción de TNF $\alpha$ , CINC-2 $\alpha\beta$  y IL-10.

Es ampliamente discutida la relación entre la composición grasa de la dieta y los efectos que ejerce sobre la salud. Aunque recientemente se ha descrito que una elevada ingesta de AG poliinsaturados  $n6$  contribuye al desarrollo de una notable inflamación crónica (Johnson y Fritsche, 2012), diferentes autores indicaron que estos AGs reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Harris *et al.*, 2009)

Respecto al ácido araquidónico, hay una aceptación general en considerar sus acciones como proinflamatorias (Khan *et al.*, 2014, Mariotto *et al.*, 2007, Nguyen *et al.*, 2012), habiéndose demostrado que el ácido araquidónico suprime la cNOS en astrocitos y neuronas, así como promueve la expresión y secreción de quimiocinas en adipocitos y estimula la migración de macrófagos. Sin embargo, hay que señalar que el efecto del ácido araquidónico sobre la respuesta inflamatoria se ha atribuido especialmente a la generación de mediadores inflamatorios derivados de su metabolismo, tales como tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs) y prostaglandinas (PGs). No obstante, se ha descrito un efecto dual en la respuesta inflamatoria ejercido por algunos de estos mediadores (Calder, 2011).

Los eicosanoides se forman principalmente desde ácido araquidónico, que tras liberarse de la membrana plasmática por acción de la PLA2 es metabolizado por las acciones secuenciales de la PG G/H sintasa o también llamada ciclooxigenasa (COX) y las posteriores sintasas específicas, así como por acción de las LOXs. La ruta de las COXs da lugar a la formación de PGs y TXs, mientras que las LOXs catalizan la

formación de LTs y ácido hidroieicosatetraenoico (HETE) (Romano y Claria, 2003, Samuelsson *et al.*, 1987). De las dos isoformas de COX (COX-1 y COX-2), COX2 es la forma inducible, y la principal responsable de formación de estos mediadores en inflamación, donde PGE2 es una de las prostaglandinas más abundantes. En la inflamación, PGE2 cobra especial interés por que está involucrada en todos los procesos que dan lugar a los síntomas clásicos del proceso inflamatorio: enrojecimiento, hinchazón y dolor (Funk, 2001).



### 3.2.2. Fosfolípidos

El tejido adiposo puede suponer una fuente importante de FLs en procesos como la pancreatitis aguda, ya que en su forma grave tiene lugar necrosis del parénquima pancreático y de la grasa peripancreática, que lleva a una rotura de membranas celulares con la consecuente liberación de FLs. Aunque existen estudios que analizan los efectos de los FLs oxidados en respuestas inflamatorias, apenas hay bibliografía que describa efectos de los FLs sin modificar químicamente. El interés de estas investigaciones radica en el hecho de que ensayos *in vitro* con los FLs oxidados pueden mimetizar los eventos principales de la iniciación y propagación de la inflamación crónica o de la coagulación en lesiones avanzadas que conducen a la trombosis. Los resultados obtenidos experimentalmente fueron la base para considerar de manera general a los FLs oxidados como agentes proinflamatorios y

aterogénicos. Sin embargo, los FLs oxidados también han demostrado ser capaces de ejercer acciones antiinflamatorias y citoprotectoras (Leitinger, 2003).

En particular aquellos FLs que contienen ácidos grasos poliinsaturados, por ser más susceptibles de sufrir reacciones químicas de oxidación por EROs y otras moléculas, generan productos derivados que se han encontrado acumulados en grandes cantidades en zonas de inflamación (Berliner *et al.*, 2001, Subbanagounder *et al.*, 2000).

Bochkov *et al.* (2010), en una extensa revisión, han recogido información acerca de los mecanismos de señalización celular involucrados en la respuesta inflamatoria desencadenada por FLs oxidados: (1) estimulación de receptores de membrana o nucleares (receptores acoplados a proteínas G, receptores tirosina cinasa, TLRs, receptores acoplados a endocitosis, PPARs); (2) estimulación de la generación de segundos mensajeros ( $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, AMPc); (3) activación de rutas de señalización (proteínas cinasas, fosfatasas y pequeñas GTPasas como Rho o Rac); (4) regulación de la activación de factores de transcripción (NF- $\kappa$ B, SREBP, STAT3, PPAR) (5) activación rutas asociadas a estrés oxidativo. Además, los FLs oxidados pueden formar complejos con proteínas, otros lípidos e incluso con el DNA. Estas nuevas estructuras representan epítomos que pueden ser reconocidos por la respuesta inmune adaptativa e innata, las cuales contribuyen significativamente a alteraciones patológicas con carácter inflamatorio (Binder, 2012).

Dependiendo de su estructura y del tipo celular sobre el que actúen, los FLs oxidados han demostrado modular la respuesta inflamatoria en uno u otro sentido, habiéndose descrito efectos tanto pro como antiinflamatorios (Bochkov *et al.*, 2010, Erridge *et al.*, 2008, Greig *et al.*, 2012). Así, se ha descrito que FLs oxidados como 1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosfocolina (PAPC), estimulan la adhesión de monocitos a células endoteliales e induce un aumento de la secreción de CCL2 e IL-8, sugiriendo su participación en la aterogénesis (Berliner, 2002, Subbanagounder *et al.*, 2002). Ahmed *et al.* (2003) obtuvieron resultados similares con 1-palmitoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (PLPC) oxidado, demostrando también una mayor interacción entre monocitos y endotelio vascular.

Además de estos efectos proinflamatorios, los FLs oxidados han demostrado ejercer un papel protector y antiinflamatorio (Leitinger, 2003). El principal mecanismo por el cual ejercen su acción antiinflamatoria parece requerir la activación de ciertos

subtipos de PPARs y pequeñas GTPasas (Greig *et al.*, 2012), sin embargo también se ha descrito que los FLs oxidados pueden ejercer efectos inhibidores sobre la señalización mediada por TLRs (Erridge *et al.*, 2008, Greig *et al.*, 2012), impidiendo su activación (Feige *et al.*, 2010), así como bloqueando la producción de citocinas proinflamatorias y atenuando la maduración de células dendríticas (Greig *et al.*, 2012). Otros estudios han demostrado la capacidad de FLs oxidados para inhibir la expresión de genes que codifican para moléculas de adhesión inducida por LPS en células endoteliales (Leitinger *et al.*, 1999, Parhami *et al.*, 1993).

También, los FLs oxidados juegan un papel importante como moduladores de la inflamación durante infecciones agudas. Estos FLs oxidados generan DAMPs (patrones moleculares asociados a daño), en analogía con los PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), los cuales detectan la presencia de infecciones. Estos DAMPs son moléculas que ejercen acciones pro y antiinflamatorias y que alteran la respuesta del hospedador a patógenos (Matt *et al.*, 2015).

#### **4. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA ACTIVIDAD DEL TEJIDO ADIPOSO**

Si tuviéramos que destacar dos patologías influidas por la actividad del tejido adiposo y además relacionadas entre sí, éstas serían la obesidad y la PA.

##### **4.1. Obesidad**

En enero de 2015 la Organización mundial de la salud define el sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. La prevalencia mundial de la obesidad se ha duplicado entre 1980 y 2014, año en el que más de 1.900 millones de adultos de 18 o más años tienen sobrepeso (aprox. un 39% de la población mundial adulta), de los cuales, más de 600 millones son obesos (aprox. un 13% de la población mundial adulta) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>). Si bien el sobrepeso y la obesidad han sido tradicionalmente considerados un problema propio de los países desarrollados, actualmente ambos trastornos están aumentando en los países menos desarrollados, en particular en los entornos urbanos, principalmente debido a cambios en los hábitos de alimentación y actividad física.

La elevada prevalencia de la obesidad supone un problema económico y de salud pública importante, debido a que algunas de las principales causas de mortalidad (enfermedades cardiovasculares o cáncer) están fuertemente asociadas con la obesidad (Mokdad *et al.*, 2003). La obesidad también da lugar a una peor calidad de vida y, por su relación con estrés oxidativo celular (Wei *et al.*, 2008), acelera daños celulares que se asemejan a una situación de envejecimiento y promueve alteraciones de la homeostasis, principalmente por influir en el metabolismo de lípidos y de la glucosa, que puede dar lugar a resistencia a insulina y/o diabetes tipo II (Ahima, 2009, Minamino *et al.*, 2009, Russell y Kahn, 2007).

La obesidad está asociada a un estado de inflamación crónica que predispone a aumentar la gravedad de otras situaciones inflamatorias, tales como quemadura grave (Ghanem *et al.*, 2011), contusión fuerte (Ciesla *et al.*, 2006), enfermedades intestinales (Karmiris y cols., 2006), osteoartritis (Toussiro *et al.*, 2007) o pancreatitis aguda (Navina *et al.*, 2011, Porter y Banks, 1991, Sempere *et al.*, 2008). La mayor parte de los resultados sobre obesidad obtenidos en clínica proceden de individuos con una excesiva acumulación de grasa localizada, habiéndose demostrado que, independientemente de la adiposidad general, es la adiposidad visceral la que se correlaciona con elevados niveles plasmáticos de IL-6 y proteína C reactiva (Beasley *et al.*, 2009).

Desde la década de los 90 se ha establecido que el origen del estado inflamatorio crónico de individuos obesos reside principalmente en el tejido adiposo (Hotamisligil *et al.*, 1995). Para acumular el exceso de ingesta energética, tiene lugar una hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos (Hausman *et al.*, 2001). Estos adipocitos hipertrofiados presentan un patrón de secreción alterado (Arai *et al.*, 2011, Bahceci *et al.*, 2007, Matsuzawa, 2010, Moreno-Aliaga *et al.*, 2010), habiéndose descrito una elevada secreción de adipocinas proinflamatorias, principalmente leptina, citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF $\alpha$ ), y quimiocinas, como CCL2. Este efecto se acompaña de una reducida producción de adipocinas antiinflamatorias como la adiponectina.

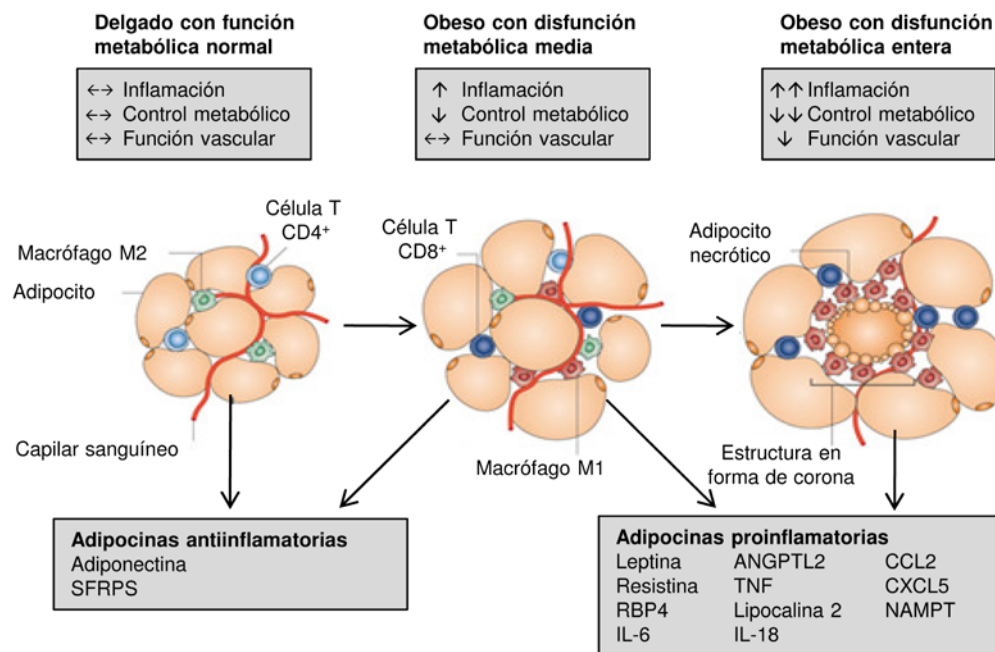
La sirtuina T1 es una histona deacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> que actúa en mamíferos como regulador de la respuesta metabólica al ayuno y a la restricción calórica (Rodgers y Puigserver, 2007). Además, esta proteína ha demostrado potenciar en el tejido adiposo la producción de adiponectina (Banks *et al.*, 2008) y reprimir rutas de señalización proinflamatorias, principalmente NF- $\kappa$ B (Ghosh *et al.*,



2007, Yeung *et al.*, 2004). Sin embargo, la expresión de sirtuina T1 en adipocitos se ha observado suprimida en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (Qiao y Shao, 2006). Una reducción en los niveles de sirtuina T1 se ha observado también en el tejido adiposo de individuos obesos, así como en modelos animales de obesidad inducida genéticamente (Costa Cdos *et al.*, 2010, Qiao y Shao, 2006). En base a ello se ha sugerido que la deficiencia de esta proteína puede favorecer la respuesta inflamatoria asociada a la obesidad.

Por otra parte, la obesidad está íntimamente relacionada con el desarrollo de un significativo estrés oxidativo (Wei *et al.*, 2008), tal que el aumento de EROs contribuiría asimismo a la activación de rutas de señalización inflamatorias.

Varios estudios han demostrado que en el tejido adiposo hipertrofiado tiene lugar una progresiva infiltración y activación de macrófagos y células T hacia el tejido graso (Kammoun *et al.*, 2014, Kraakman *et al.*, 2014, Weisberg *et al.*, 2003). Durante la obesidad, la quimiocina CCL2 se secreta en niveles altos promoviendo el reclutamiento de macrófagos hacia el tejido adiposo (Maury y Brichard, 2010), un efecto observado tanto en humanos como en modelos de obesidad en ratón (Kintscher *et al.*, 2008). Además, se ha descrito una polarización de los macrófagos con fenotipo antiinflamatorio M2 a macrófagos con fenotipo proinflamatorio M1 en el tejido adiposo durante la obesidad, lo cual contribuye también a la generación del estado inflamatorio (Lumeng *et al.*, 2008, Lumeng *et al.*, 2007) observado en individuos obesos. Estos macrófagos M1 normalmente se encuentran acumulados alrededor a los adipocitos necróticos hipertrofiados formando una estructura en forma de corona (Cinti *et al.*, 2005) (Figura 2).



**Figura 2. Modulación fenotípica del tejido adiposo.** El tejido adiposo puede ser descrito en, al menos, tres clasificaciones: delgado con función metabólica normal, obeso con disfunción metabólica media, y obeso con disfunción metabólica completa. Según se desarrolla la obesidad, los adipocitos se hipertrofian debido a un incremento en el almacenamiento de triglicéridos. Ello conlleva a una activación de células inmunes, como es el cambio de fenotipo de los macrófagos M2 a M1, o de las células T. SFRP5: proteína secretada similar a *frizzle* número 5; RBP4: proteína transportadora de retinol tipo 4; ANGPTL2: proteína similar a angiopoyetina 2; TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleucina; CCL2: ligando 2 de la quimiocina C-C; CXCL5: ligando 5 de la quimiocina CXC; NAMPT: nicotinamida fosforibosiltransferasa. (Adaptado de Ouchi N., *et al.*, 2011. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 85-97).

Por otra parte, se han descrito cambios en la composición de la grasa corporal durante la obesidad. Navina *et al.* (2011) comprobaron una elevada proporción de AGs insaturados, que unido al incremento de la masa adipocitaria de la grasa visceral, supone un aumento de hasta un 300% de este tipo de AGs, con efectos citotóxicos y proinflamatorios a nivel local y sistémico. Además, en ratones alimentados con una dieta rica en grasas, se ha observado un aumento de TGs ricos en AGs insaturados, así como un enriquecimiento de AA en la composición de FLs (Pinnick *et al.*, 2008).

#### 4.2. Pancreatitis aguda

La PA es una enfermedad inflamatoria del páncreas que representa un problema clínico sustancial, con una incidencia anual en Europa y EEUU de 30 casos por cada 100.000 habitantes (Roberts *et al.*, 2013), alcanzando las 275.000 admisiones hospitalarias anuales en EEUU, lo cual supone un coste económico de

2.600 millones de dólares (Peery *et al.*, 2012). El aumento en la incidencia de PA observado en las últimas décadas se ha atribuido principalmente al incremento de obesidad, especialmente con una distribución androide de la grasa (Mery *et al.*, 2002, Sempere *et al.*, 2008), así como al incremento en el consumo de alcohol (Yadav y Lowenfels, 2013).

Desde que en 1.889 Fitz realizase una primera clasificación de se han sucedido otras muchas, la más reciente debida a Banks *et al.* (2013). En ella, los criterios morfológicos sirven de base para la definición de dos formas clínicas predominantes: PA edematosa y PA necrotizante. La forma más frecuente es la pancreatitis edematosa, de carácter leve y autolimitante, caracterizada por edema, infiltración de células inflamatorias en el páncreas y presencia de ascitis. Por otra parte, en la pancreatitis necrotizante se aprecia necrosis del tejido pancreático, así como de la grasa intra y peripancreática y hemorragia variable, que frecuentemente se complica con la infección de las zonas necróticas (Beger *et al.*, 1997). Este tipo de PA está asociado a una fuerte respuesta inflamatoria sistémica y una tasa de mortalidad de hasta el 20% (Howard *et al.*, 2007, Uhl *et al.*, 2002).

#### **4.2.1. Etiología y patogenia**

Los casos clínicos más frecuentes de PA son de etiología biliar y debidos también al consumo abusivo de alcohol (Lankisch *et al.*, 2015). La hipertrigliceridemia se observa entre el 12 y 39% de pacientes con PA (Jiménez Forero *et al.*, 2008), sin estar bien definido si es causa de la enfermedad o consecuencia derivada de las alteraciones metabólicas que, con frecuencia, acompañan a la PA. En cualquier caso, derivados lipídicos pueden contribuir al desarrollo y evolución de esta patología.

El mecanismo inicial que se considera desencadenante de la PA es la activación prematura de enzimas digestivas en el interior de las células acinares pancreáticas, evento que conduce a la autodigestión del páncreas (Bradley, 1994). Esta activación de zimógenos se ve favorecida por el bloqueo secretor descrito durante la PA humana y experimental (Mitchell *et al.*, 1983, Saluja, 1989), que resulta de una serie de alteraciones estructurales en la célula acinar, tanto de los componentes del citoesqueleto como de otras proteínas que participan en los procesos de fusión de membranas durante la exocitosis (Gaisano, 2000). El tráfico normal de las vesículas secretoras se altera, produciéndose la descarga basolateral del contenido de los gránulos de zimógeno, en lugar del proceso normal de exocitosis

que ocurre en el polo apical de la célula (Scheele, 1987, Uruñuela *et al.*, 2000). Es por ello que tanto la tripsina activa, como lipasas y PLA2, entre otras enzimas, se liberan al intersticio pancreático y difunden al espacio peripancreático actuando sobre la propia glándula y tejidos vecinos, causando necrosis pancreática y grasa, además de una abundante infiltración de neutrófilos (Franco-Pons *et al.*, 2010).

Las células acinares generan, desde etapas muy tempranas de la enfermedad, grandes cantidades de EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) (Escobar *et al.*, 2012, Folch *et al.*, 1998, Uruñuela *et al.*, 2002b), entre las cuales se hallan el radical hidroxilo, anión superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico o peroxinitrito, que dan lugar a un estrés oxidativo y/o nitrosativo. Este aumento de especies reactivas causa, a su vez, alteraciones bioquímicas y funcionales en distintas estructuras celulares, tales como peroxidación de lípidos de membrana plasmática y orgánulos intracelulares (Nonaka *et al.*, 1990, Schoenberg *et al.*, 1994, Schulz *et al.*, 1999), oxidación de proteínas enzimáticas y estructurales (Reinheckel *et al.*, 1999) y daño oxidativo en el ADN (Wiseman y Halliwell, 1996). Además, EROs están involucrados en la producción de citocinas y quimiocinas durante PA (Pereda *et al.*, 2006, Yubero *et al.*, 2009b), habiéndose establecido una correlación entre la intensidad de estrés oxidativo asociada a diferente gravedad de PA y la capacidad de la célula acinar para producir mediadores inflamatorios (Yubero *et al.*, 2009b).

Otro factor patogénico de la PA involucrado especialmente en las primeras fases de la enfermedad es la alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Criddle *et al.*, 2007). Un aumento sostenido en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en células acinares se ha observado en diferentes modelos experimentales de PA (Uruñuela *et al.*, 2002a, Ward *et al.*, 1996), habiéndose demostrado que juega un papel clave en la activación intraacinar de tripsinógeno (Saluja *et al.*, 1999). Contribuye al estrés oxidativo y al daño estructural y funcional de las células acinares, alterando el citoesqueleto y la integridad de la membrana (Malis y Bonventre, 1986).

#### **4.2.2. Respuesta inflamatoria**

Como consecuencia de una excesiva generación de EROs en la célula acinar, que no pueden ser eficazmente balanceados por los sistemas antioxidantes, se inicia una cascada de reacciones que hacen que la célula acinar sea la fuente inicial de mediadores inflamatorios (Ramudo *et al.*, 2005a). Además, los EROs liberados desde la célula acinar al espacio intersticial actúan como moléculas quimioatrayentes de

células inflamatorias circulantes (Poch *et al.*, 1999, Yubero *et al.*, 2009b). EROs generados en etapas tempranas de la PA participan en procesos de modulación epigenética y/o muerte celular (Ohashi *et al.*, 2006, Sandoval *et al.*, 2010). A la respuesta inflamatoria localizada inicialmente en el páncreas, le sigue una extensión sistémica promovida por una producción exagerada de mediadores inflamatorios, tanto desde células acinares como de leucocitos infiltrados en la glándula y células endoteliales vasculares. Se inicia así un círculo vicioso por el cual las propias citocinas potencian reacciones de estrés oxidativo y estimulan la síntesis de más mediadores inflamatorios. En esta fase se instaura una respuesta inflamatoria sistémica, que afecta a órganos distantes del páncreas, como el hígado, pulmón, riñón y sistema cardiovascular (Makhija y Kingsnorth, 2002, McFadden, 1991, Ranson *et al.*, 1974). Esta respuesta se puede agravar, desarrollándose entonces el síndrome de disfunción multiorgánica responsable de la mayor parte de las muertes asociadas a PA, y en el cual el pulmón suele ser el primer órgano afectado, con el desarrollo del síndrome de disfunción respiratoria del adulto (Bhatia *et al.*, 2000, Bhatia *et al.*, 2005).

A pesar de que no se conoce el motivo por el cual algunas PA no pasan de una gravedad media, y otras progresan hacia una forma más grave, se ha descrito que la extensión del daño pancreático y la necrosis asociada dan lugar a la activación de mecanismos fisiopatológicos involucrados en la respuesta inflamatoria sistémica, siendo las citocinas y el estrés oxidativo los componentes principales de dicha respuesta (Gomez-Cambronero *et al.*, 2002).

La respuesta inflamatoria local requiere la activación de cascadas de señalización que, a su vez, modulen la activación de distintos factores de transcripción en células acinares, células inflamatorias infiltradas y células del endotelio vascular, responsables de la expresión de genes de distintos factores inflamatorios (citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión).

Las EROs han demostrado ser importantes activadoras de MAPKs (Chin *et al.*, 2008, Jang *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2008) en diferentes tipos celulares. En la familia de MAPKs se han descrito tres miembros: p38-MAPK, ERK (cinasa regulada por señales extracelulares) y JNK/SAPK (cinasa “Jun” N-terminal/proteína cinasa activada por estrés) (McCubrey *et al.*, 2006, Schafer y Williams, 2000). Su activación se ha visto en células acinares pancreáticas (Ramudo *et al.*, 2005a, Yubero *et al.*, 2009a), leucocitos (Gwinn y Vallyathan, 2006, Hambleton *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 2003) y células endoteliales (Bochkov *et al.*, 2002, Hennig *et al.*, 2006). Su regulación

depende de la fosforilación de un motivo conservado T-X-Y (Thr-X-Tyr) por medio de otras cinasas. Las MAPKs actúan como “up-streams” en la expresión de factores inflamatorios a través de la activación de factores de transcripción (Liu *et al.*, 2003, Ramudo *et al.*, 2009).

Entre los factores de transcripción influidos por MAPKs y que participan en la respuesta inflamatoria durante PA, cabe destacar el factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), las proteínas transductoras de la señal y activadoras de la transcripción (STAT) y la proteína activadora-1 (AP-1). Todos ellos requieren de fosforilaciones para su activación.

Otro grupo enzimático, las MAPK fosfatasas (MKPs), ejerce el efecto opuesto, y el balance entre ambos grupos de enzimas determina la activación posterior de la cascada inflamatoria en PA. Además, se ha descrito la implicación de varias proteínas fosfatasas (PP2A, PP2B, PP2C, MKP1, MKP2, MKP3) en células acinares expuestas a NaTc (Sandoval *et al.*, 2009). La proteína CD45 es una MKP bien reconocida en leucocitos y también descubierta por nuestro grupo de investigación en la célula acinar (De Dios *et al.*, 2005). Deficiencia en la expresión de CD45 se ha reportado en célula acinar de ratas con PA asociada a un aumento de expresión de TNF $\alpha$  (De Dios *et al.*, 2006), reforzando el papel modulador de esta proteína en la respuesta inflamatoria.

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que juega un papel clave en rutas de señalización inflamatorias. Regula la expresión de numerosas citocinas (p.ej. IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ ), quimiocinas (p.ej. IL-8, MIP-1A, CCL2), moléculas de adhesión (p.ej. ICAM, VCAM, selectinas) y enzimas inducibles por efector (p.ej. iNOS y COX-2) (Ghosh y Karin, 2002). Durante la PA, tanto EROs como TNF $\alpha$  actúan como señales inductoras de la activación de NF- $\kappa$ B (Brady *et al.*, 2002, Pereda *et al.*, 2006, Ramudo *et al.*, 2005a, Satoh *et al.*, 2005).

Por otra parte, las proteínas STATs son una familia de proteínas a las que, como su propio nombre indica, se les atribuye dos funciones principales: actuar como señales de transducción en el citoplasma y como activadores de la transcripción en el núcleo. Se encuentran como proteínas latentes en el citoplasma de las células y su activación, según demuestran diversos estudios, está mediada por las proteínas JAKs (Janus cinasas) (Silvennoinen *et al.*, 1993), una familia de tirosinas cinasas implicadas en la señal de transducción de muchos miembros de la familia de las

citocinas (Darnell *et al.*, 1994). De las proteínas STATs se han descrito hasta 7 tipos, siendo la STAT3 la más relacionada con la respuesta inflamatoria en PA, habiéndose descrito la participación de la ruta STAT3 en la expresión de citocinas en células acinares pancreáticas aisladas del páncreas de ratas con PA (Gutierrez *et al.*, 2008) y células acinares de animales control incubadas con fluido ascítico de ratas con PA (Ramudo *et al.*, 2009), así como en células acinares de ratas con PA media y grave (Yubero *et al.*, 2009a, b).

AP-1 es un factor de transcripción involucrado en la activación de genes asociados con funciones celulares tales como crecimiento, diferenciación, proliferación y estrés celular. La activación de AP-1 es inducida por distintos estímulos tales como EROs y citocinas (Angel y Karin, 1991), y su actividad está regulada por fosforilaciones a través de MAPKs. Activación de AP-1 se ha demostrado en PA inducida por infusión retrógrada de taurocolato (Vaquero *et al.*, 2001), o por ceruleína (Gukovsky *et al.*, 2003).

Como resultado de la activación de los factores de transcripción, se ha descrito que las células acinares son una fuente importante de mediadores inflamatorios durante PA (Ramudo *et al.*, 2005a), aunque también contribuyen a esta respuesta otros tipos celulares, tales como células endoteliales, neutrófilos, linfocitos y macrófagos (Makhija y Kingsnorth, 2002), liberando citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 (Frossard *et al.*, 2001, McKay, 1996), o IL-8 (Ruthenb rger *et al.*, 2000, Wereszczynska-Siemiatkowska *et al.*, 1998). Estas moléculas provocan un aumento de la permeabilidad vascular, adhesión e infiltración de leucocitos en el páncreas (Kusske *et al.*, 1996), un proceso en el que también participan selectinas, integrinas y moléculas de la familia de las inmunoglobulinas (Albelda, 1994, Bhatia *et al.*, 2000, Folch *et al.*, 1999). Los neutrófilos infiltrados amplifican la respuesta inflamatoria mediante la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$  (Kusske *et al.*, 1996).

IL-6, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son citocinas clave en el curso de la PA y ambas ejercen efectos sinérgicos en la amplificación de la respuesta inflamatoria. TNF $\alpha$  desencadena se nalizaci n de muerte celular a través de mecanismos divergentes mediados por PKC y causa la activación de NF- $\kappa$ B, dando lugar a la activación de rutas proinflamatorias (Hughes *et al.*, 1996, Satoh *et al.*, 2005). Por su parte, IL-1 $\beta$  es producida principalmente por macrófagos (Bhatia *et al.*, 2000) y ejerce acciones

sobre la respuesta inflamatoria similares a las de  $\text{TNF}\alpha$ . Otra citocina que juega un papel importante en el desarrollo de PA es IL-6, cuya concentración plasmática se correlacionan con la gravedad de la enfermedad en pacientes con PA, por lo que se ha propuesto a esta interleucina como indicador de la gravedad (Leser *et al.*, 1991, McKay, 1996, Viedma *et al.*, 1992). Otro mediador relacionado con la respuesta inflamatoria sistémica en PA es el factor activador de plaquetas (PAF), un lípido que funciona como citocina proinflamatoria, dado que induce la activación y agregación de plaquetaria, la activación de neutrófilos y monocitos, la quimiotaxis, la vasodilatación, así como incrementa la permeabilidad vascular (McKay *et al.*, 1997, Norman, 1998).

Además de citocinas, durante la PA se producen quimiocinas y moléculas de adhesión que contribuyen a la respuesta inflamatoria. Entre las quimiocinas más relevantes que juegan un papel clave en el curso de la PA se hallan IL-8, CCL2, CINC (Brady *et al.*, 2002, Yubero *et al.*, 2009a, b), potentes quimioatrayentes de leucocitos. Las moléculas de adhesión también participan en el reclutamiento leucocitario hacia tejidos durante PA. Miembros de esta familia como P-selectina e ICAM-1 se expresan en células acinares, monocitos y en la superficie de células endoteliales y juegan un papel importante en el curso de esta enfermedad (Folch *et al.*, 1999, Frossard *et al.*, 1999, Lau y Bhatia, 2007, Ramudo *et al.*, 2007, Yubero *et al.*, 2009c).

En un intento de resolver la respuesta inflamatoria durante la PA también se pueden producir citocinas antiinflamatorias, tal que el balance entre éstas y los mediadores proinflamatorios determina el destino final de la enfermedad.

Entre los mediadores antiinflamatorios destacan la IL-10 y las proteínas asociadas a pancreatitis (PAPs). IL-10 es producida principalmente por leucocitos, pero también por la célula acinar durante la PA (De Dios *et al.*, 2002, Hanada y Yoshimura, 2002, Ramudo *et al.*, 2005b). Esta citocina ejerce sus efectos antiinflamatorios a través de la inhibición de la producción de  $\text{IL-1}\beta$  y  $\text{TNF}\alpha$  (Fiorentino *et al.*, 1991), así como de la inducción de la síntesis de antagonistas de citocinas como IL-1Ra y receptores  $\text{TNF}\alpha$ . Por otro lado, PAPs han demostrado inhibir la respuesta inflamatoria por impedir la activación de NF-kB (Folch-Puy *et al.*, 2006a), y por reducir la producción de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión (Folch-Puy *et al.*, 2006a, Gironella *et al.*, 2007, Vasseur *et al.*, 2004).



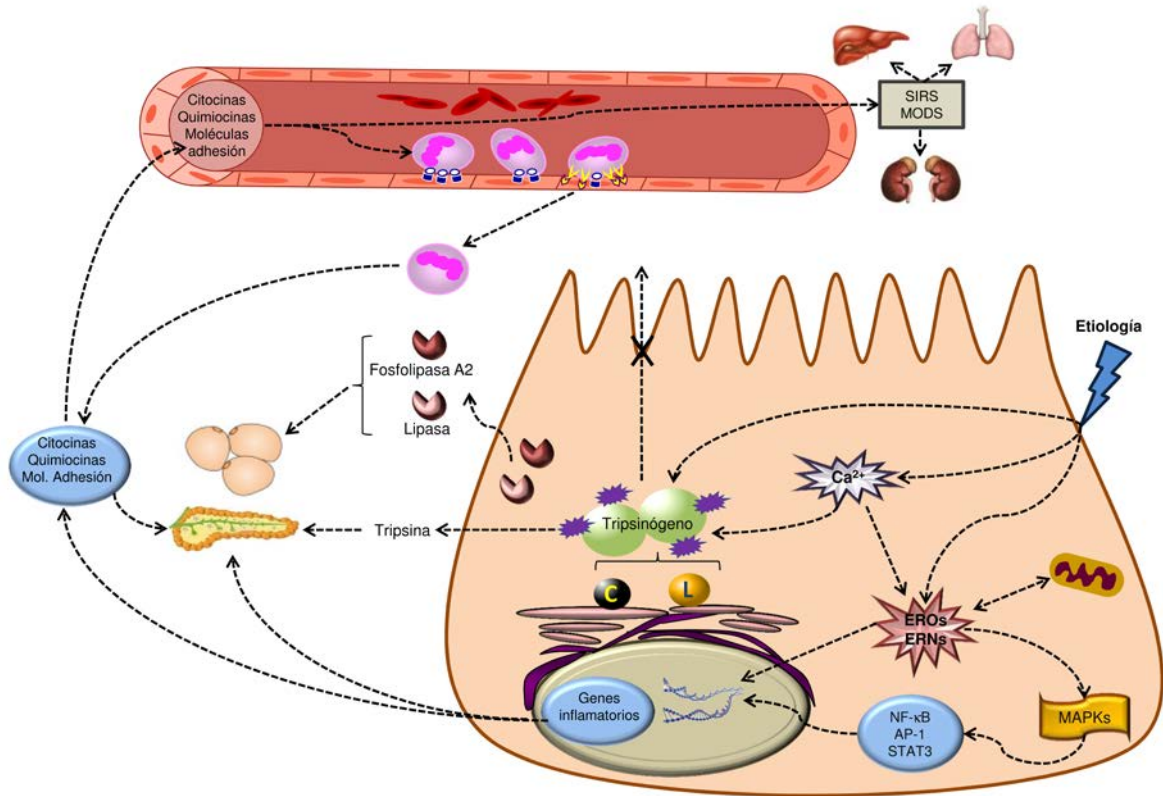


Figura 3. Resumen esquemático de los principales mecanismos patogénicos de PA.

#### 4.2.3. Participación de los lípidos en la pancreatitis aguda

Hay evidencias clínicas y experimentales que demuestran un papel importante de los lípidos en el desarrollo y evolución de la PA.

Por diferentes mecanismos, la hiperlipidemia es un factor de riesgo de PA. Influye en la hemodinámica sistémica, incluyendo la perfusión pancreática, debido a la deposición lipídica en las paredes de los vasos sanguíneos, un efecto que favorece una situación de isquemia pancreática. Además, promueve la activación de células endoteliales, la adhesión leucocitaria, y contribuye al desarrollo de alteraciones metabólicas (Popov *et al.*, 2003, Stokes y Granger, 2005). Se ha establecido la hipertrigliceridemia como causa de PA, siendo el tipo V el más frecuente, aunque también se ha descrito la contribución de la hipertrigliceridemia tipo I y IV (Toskes, 1990).

Una característica común de la PA clínica y experimental, es el aumento de concentraciones de AGs en plasma (Domschke *et al.*, 1993, Paye *et al.*, 1995) y fluido

ascítico (Pappas *et al.*, 1981), resultado de la secreción anómala desde acinos pancreáticos de grandes cantidades de lipasa y fosfolipasa, capaces de actuar sobre el tejido graso circundante. Aunque el estímulo para la liberación de AGs desde TGs de adipocitos no es bien conocido, se ha reconocido en los adipocitos la expresión de un receptor acoplado a proteína G activado por tripsina (Asfaha *et al.*, 2007, Strande y Phillips, 2009), lo que en parte explicaría como la secreción basolateral de esta enzima durante PA puede afectar a la lipólisis.

Se ha propuesto que AGs podrían iniciar un ataque de PA (Cameron *et al.*, 1974), induciendo la activación intracelular de tripsinógeno (Halangk *et al.*, 2000). De hecho, se utiliza la perfusión intrapancreática de ácido oleico para inducir experimentalmente PA (Vollmar *et al.*, 1991). Si la PA se ha desencadenado por cualquier otra etiología, los AGs actuarían como mecanismos patogénicos de la enfermedad, contribuyendo a la necrosis pancreática y al aumento en la expresión de factores inflamatorios (Navina *et al.*, 2011). Este aspecto cobra especial interés en individuos obesos.

La obesidad por sí misma se considera un factor de riesgo para el desarrollo de PA (Martinez *et al.*, 2006, Suazo-Barahona *et al.*, 1998). Clínicamente se confirma que la PA cursa con complicaciones locales y sistémicas, aumenta el riesgo de desarrollar fallo multiorgánico y muerte (Abu Hilal y Armstrong, 2008, Martinez *et al.*, 2006).

Diferentes efectos han sido atribuidos a los AGs en su contribución a agravar la PA. La correlación entre la grasa corporal y la progresión de PA ha dado lugar a un creciente interés en comprender los cambios que tienen lugar en el tejido adiposo durante PA, donde se ha descrito que extractos lipídicos de fluido ascítico aumentan la activación de macrófagos (Gutierrez *et al.*, 2008), un efecto que parece estar relacionado con las modificaciones oxidativas de AGs, que se estarían liberando desde áreas de necrosis grasa peripancreática. Por otra parte, una diferente composición de la grasa se ha observado en ratones obesos con un aumento de AGs insaturados (Navina *et al.*, 2011) y unas concentraciones basales elevadas de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  o IL-6 en comparación con ratones de fenotipo delgado (Mathur *et al.*, 2007, Zyromski *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que los AGs insaturados (más de un 70% del total de AGs presentes en los TGs almacenados en el tejido adiposo), son capaces de iniciar la

peroxidación de otros compuestos lipídicos (Yamamoto *et al.*, 1982a, b), lo que ocasionaría una reacción en cadena que alteraría la estructura de las membranas celulares y conduciría a la muerte. Estos AGs pueden ser absorbidos por el sistema portal y transportados hasta el hígado, donde serán convertidos nuevamente a TGs, pudiendo explicar la hipertrigliceridemia observada en pacientes con pancreatitis (Gutierrez *et al.*, 2008), entendiéndose así esta alteración lipídica también como una consecuencia del desarrollo de PA.

Recientemente, se ha demostrado recientemente que los efectos tóxicos de los AGs liberados por el tejido adiposo peripancreático contribuye a aumentar el daño de células pancreáticas e incrementar la expresión de citocinas y quimiocinas (Navina *et al.*, 2011).

En comparación con ratas y ratones de fenotipo delgado, elevadas concentraciones de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  (Pérez-Garrido, 2013, Segersvard *et al.*, 2008), IL-1 $\beta$  o IL-6 (Mathur *et al.*, 2007, Zyromski *et al.*, 2009), se han observado en obesos.

Varios estudios han demostrado además que los AGs insaturados causan hipocalcemia, saponificación de lípidos peritoneales (Dettelbach *et al.*, 1990) y apoptosis (Hussain *et al.*, 1998).

No obstante, los efectos inflamatorios y tóxicos de los AGs son muy distintos en función del tipo de AGs o del nivel de insaturación (Navina *et al.*, 2011). Por una parte, los AGs poliinsaturados n3 ejercen acciones antiinflamatorias que podrían resultar beneficiosas en PA, entre las que se encuentran: disminución de la quimiotaxis leucocitaria, reducción de la expresión de moléculas de adhesión y producción de citocinas inflamatorias. Algunos de estos efectos son ejercidos en monocitos y linfocitos a través de la reducción de la activación de NF- $\kappa$ B, además de actuar como ligandos de PPAR $\gamma$  (Calder, 2008, Shaikh *et al.*, 2012). Estudios en cultivos celulares han demostrado que EPA y DHA inhiben la producción de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en monocitos (Babcock *et al.*, 2002), así como la producción de IL-6 y IL-8 en células endoteliales vasculares (De Caterina *et al.*, 1994, Khalifoun *et al.*, 1997).

Por el contrario, el ácido linoleico (n6) puede contribuir a aumentar la respuesta inflamatoria, habiéndose sugerido que este efecto sea debido a que promueve la formación de ácido araquidónico. Como las células inflamatorias

contienen típicamente una proporción elevada de AG poliinsaturados y baja de otros AG poliinsaturados 20C, el ácido araquidónico es el principal sustrato para la síntesis de eicosanoides proinflamatorios (PGE2, LTB4 y TXA2) (Innis, 2007, Lands, 2005, Simopoulos, 2008a, b), siendo estos metabolitos los intermediarios entre AGs poliinsaturados e inflamación. A diferencia de la respuesta antiinflamatoria mediada por los eicosanoides derivados de los AGs n3, los formados desde ácido araquidónico son proinflamatorios o muestran efectos perjudiciales (Bagga *et al.*, 2003, Robinson y Stone, 2006).

Debido a que las diferentes zonas de tejido adiposo del organismo poseen diferentes características, como el tamaño celular, las respuestas proliferativas, o la habilidad de reaccionar a estímulos hormonales y farmacológicos (Romero *et al.*, 2009, Villena *et al.*, 2001), Gea-Sorlí y cols. (2012) propusieron que estas diferencias podrían estar involucradas en la importancia del índice de masa corporal y la distribución grasa en la correlación entre el tejido adiposo y la gravedad de la PA. Adicionalmente, se ha observado que el páncreas de ratones obesos contenía un mayor volumen de grasa, una diferente composición de la misma, y unos niveles basales elevados de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  o IL-6 en comparación con ratones de fenotipo delgado (Mathur *et al.*, 2007, Zyromski *et al.*, 2009).

#### **4.2.3.1. Modificaciones químicas de los compuestos lipídicos**

Durante la PA, la acción proteolítica de la tripsina, junto con los efectos citotóxicos de los AGs resultantes de la acción lipolítica de la lipasa y la fosfolipasa, causan daño celular y necrosis acinar y grasa de regiones peri-pancreáticas. Necrosis en el tejido adiposo de la zona abdominal (peripancreático, retroperitoneal, mesentérico) es una evidencia tanto en PA clínica como experimental de cierta gravedad. La necrosis contribuye a una infiltración masiva de células inflamatorias, especialmente neutrófilos, un hecho claramente observable en las áreas de necrosis grasa en PA grave inducida por NaTc (Gea-Sorli *et al.*, 2012). Los neutrófilos liberan una hemoproteína llamada mieloperoxidasa (MPO), la cual cataliza la reacción entre el ion cloruro y el peróxido de hidrógeno para producir ácido hipocloroso (HOCl), un potente agente citotóxico con un papel clave para matar bacterias y otros patógenos (Malle *et al.*, 2007) debido a su gran capacidad para oxidar y/o clorar otros compuestos (Spickett, 2007).



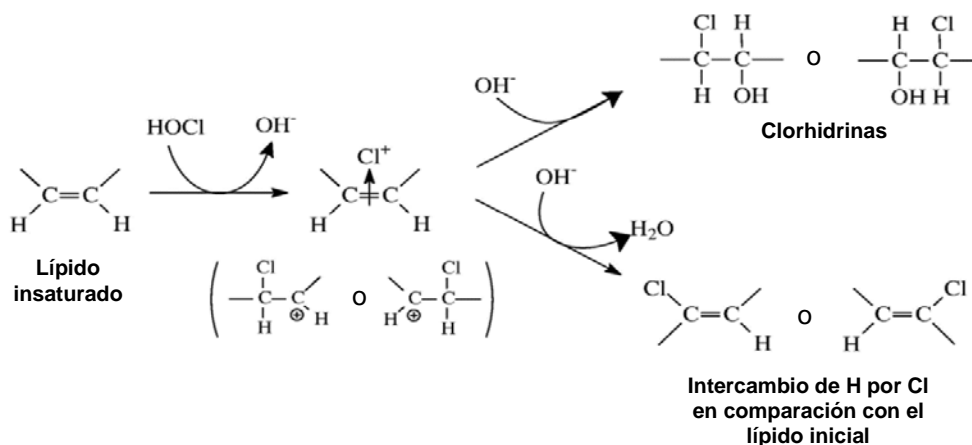
Sin embargo, una generación excesiva de HOCl causa daño en el tejido circundante dada su elevada reactividad con diferentes moléculas, tales como proteínas, DNA, NADH (Prutz, 1996), lípidos (Winterbourn *et al.*, 1992), colesterol (Carr *et al.*, 1996), tioles y disulfuros libres (Prutz, 1996, Winterbourn y Brennan, 1997). Se ha sugerido que las reacciones de oxidación llevadas a cabo por HOCl son, en muchos casos, más rápidas que las reacciones de cloración (Folkes *et al.*, 1995). Sin embargo, ya que la cloración inicial puede dar lugar a productos inestables que se degradan a productos no clorados, discriminar entre estos dos tipos de reacción no es sencillo (Pattison y Davies, 2006). Hay un mayor interés en las reacciones que resultan de los procesos de cloración, debido a que los productos clorados podrían ser potenciales biomarcadores de la actividad mieloperoxidasa (Winterbourn y Kettle, 2000).

La observación de compuestos orgánicos halogenados en la naturaleza se remonta a la década de 1960 (Fowden, 1968), y desde entonces se ha descrito una gran variedad de estos compuestos ampliamente distribuidos. No obstante, el proceso de halogenación lipídica en mamíferos no se considera un proceso habitual en situaciones fisiológicas, sino que está asociado a condiciones adversas, como infección e inflamación, y está considerado como un proceso dañino e indeseable (Hawkins *et al.*, 2003, Spickett, 2007).

En la reacción de HOCl o del sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl con AGs insaturados, como el ácido oleico o linoleico, se pierden las insaturaciones y se generan sus respectivos derivados clorados, las clorhidrinas (Franco-Pons *et al.*, 2013, Winterbourn *et al.*, 1992).

La química de la adición de HOCl a los dobles enlaces para formar clorhidrinas se conoce bien (March, 1977), habiéndose estudiado en detalle en varios AGs y FLs (Arnhold *et al.*, 2001, Carr *et al.*, 1997, Jerlich *et al.*, 2000, Panasencko *et al.*, 2003). Esta reacción de formación de clorhidrinas pertenece a las llamadas reacciones de adición electrofílica, y puede ser dividida en dos partes. En primer lugar, una molécula de ácido hipocloroso se añade al doble enlace, donde el cloruro actúa como una especie electrofílica y polariza la insaturación. Como resultado, el átomo de cloro queda unido a uno de los átomos de carbono, mientras que el otro átomo de carbono

adquiere una carga positiva. Así, el doble enlace del AG se pierde. El segundo paso consiste en la adición de una molécula de agua, donde se inserta un hidroxilo en el carbono que adquirió carga positiva.



**Mecanismo de formación de clorhidrinas de AGs insaturados.** (Adaptado de Spickett C. M., 2007. *Pharmacol. Ther.* 115, 400-409).

Las clorhidrinas son compuestos más polares que sus respectivos ácidos grasos, un hecho que podría alterar las membranas celulares y causar la lisis y muerte celular (Carr *et al.*, 1996, Carr *et al.*, 1997). Además de su toxicidad directa, las clorhidrinas han demostrado ejercer numerosas acciones proinflamatorias en macrófagos peritoneales (Franco-Pons *et al.*, 2013).

Además de estas modificaciones, durante la pancreatitis alcohólica se ha observado que los AGs pueden iniciar los mecanismos patogénicos debido a la formación de etil-ésteres de AGs (Cridde *et al.*, 2004, Werner *et al.*, 1997), metabolitos no oxidativos generados por la combinación de AGs y etanol, los cuales favorecen la progresión hacia una pancreatitis crónica. Estos AGs esterificados actuarían vaciando las reservas de calcio intracelular con el consiguiente aumento de la concentración de calcio citosólico, un aumento que si se mantiene por un periodo prolongado desencadena un proceso necrótico (Cridde *et al.*, 2006, Cridde *et al.*, 2004).

Además de los AGs, los FLs también se han visto implicados en diversas enfermedades, tales como aterosclerosis, daño pulmonar, inflamación aguda, artritis reumatoide, diabetes, isquemia, leprosis o esclerosis múltiple (Bochkov *et al.*, 2010, Leitinger, 2008). En algunas patologías con un componente inflamatorio, se ha visto que los FLs pueden resultar modificados químicamente (Leitinger, 2003,

Subbanagounder *et al.*, 2000). Entre las modificaciones químicas, cabe destacar que los FLs, especialmente aquellos que poseen AGs poliinsaturados, pueden ser peroxidados por radicales libres, y los grupos acil-graso insaturados pueden ser oxidados por especies no-radicales como peroxinitrito y HOCl. Dado que los FLs son los componentes principales de las membranas celulares y las lipoproteínas plasmáticas circulantes, estas son las fuentes principales de FLs oxidados.

Hay un creciente interés en esclarecer la contribución de los FLs oxidados a las patologías inflamatorias y determinar los mecanismos de señalización molecular que expliquen sus efectos (Bochkov *et al.*, 2010). Está descrito que la exposición de lipoproteínas de baja densidad (LDL) humanas con HOCl o MPO, a concentraciones similares a las que se hallan en lesiones ateroscleróticas, genera clorhidrinas de FLs (Jerlich *et al.*, 2000), las cuales han demostrado en células mieloides humanas disminuir los niveles de ATP y reducir su viabilidad (Dever *et al.*, 2003). Asimismo, se ha descrito que las LDL también son susceptibles a la oxidación por HOCl, dando lugar a moléculas oxidadas con efectos proinflamatorios, tales como la inducción de la expresión de IL-8 en monocitos humanos y la estimulación de la quimiotaxis de neutrófilos (Woenckhaus *et al.*, 1998), la activación de NADPH oxidasas en macrófagos (Nguyen-Khoa *et al.*, 1999), y la adhesión de leucocitos polimorfonucleares a células endoteliales de vena umbilical humana (Kopprasch *et al.*, 1998). Por ello, se ha sugerido que los derivados halogenados y/u oxidados tanto de FLs como de AGs podrían contribuir a los efectos proinflamatorios deletéreos de las LDL modificadas por acción del HOCl (Dever *et al.*, 2006).

A pesar de los efectos descritos para FLs oxidados en diferentes patologías, su participación en la respuesta inflamatoria durante PA no ha sido apenas estudiada con detalle, habiendo encontrado solamente el trabajo llevado a cabo por Li *et al.* (2007). Es interesante profundizar en el papel de estos compuestos durante la enfermedad, dada la intensa actividad enzimática a la que están expuestos los componentes de las membranas celulares durante la PA y su exposición a agentes prooxidantes.





## II. OBJETIVOS



El **objetivo general** de esta Tesis doctoral es investigar la capacidad de la célula acinar pancreática para desarrollar una respuesta inflamatoria en presencia de diferentes lípidos, generados en tejido adiposo necrótico peripancreático durante la pancreatitis aguda necrotizante, por las consecuencias que ello podría tener en el desarrollo y evolución de la enfermedad. Es nuestro interés profundizar en los mecanismos de acción involucrados, para que su conocimiento sirva de base en el planteamiento de estrategias paliativas del proceso inflamatorio en la pancreatitis aguda.

Los **objetivos concretos** son:

- 1) Analizar la respuesta acinar a extractos lipídicos obtenidos de focos necróticos de ratas con pancreatitis aguda grave.
- 2) Analizar la respuesta acinar a la fracción total de ácidos grasos y a clorhidrinas de ácidos grasos, generadas como consecuencia de la infiltración de neutrófilos.
- 3) Investigar la contribución relativa a la respuesta acinar de los ácidos grasos saturados e insaturados más abundantes
- 4) Analizar la respuesta acinar a fosfolípidos, eligiendo POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) por ser el más representativo, e investigar si el proceso de oxidación al que están expuestos durante la pancreatitis aguda modifica su actividad.
- 5) Evaluar la eficacia del uso de fármacos que interactúan con las rutas de señalización de la respuesta acinar a lípidos, como potencial tratamiento de la pancreatitis aguda.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS



## **1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS**

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso comprendido entre 250 y 300 g, alimentadas con pienso comercial estándar para animales del laboratorio (Teklad-Harlan 2014) y con libre acceso a agua. Los animales fueron suministrados y mantenidos por el Servicio de Experimentación Animal (S.E.A.) de la Universidad de Salamanca, cumpliendo la normativa impuesta por el Consejo Europeo que regula la protección de animales utilizados para fines científicos (2010/63/EU), y la homóloga legislación española (RD 53/2013). Los animales se mantuvieron en jaulas ubicadas en habitaciones termostatzadas a una temperatura de 21-23°C y alternando periodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

### **Grupos experimentales**

Los animales se distribuyeron de forma aleatoria en los siguientes grupos experimentales:

#### **A1. Control**

Animales no sometidos a ningún tipo de manipulación quirúrgica ni tratamiento.

#### **A2. Pancreatitis aguda inducida por infusión de taurocolato sódico (PA-NaTc)**

Este modelo de PA se indujo siguiendo el método descrito por Aho y Nevalainen (1980) según el siguiente protocolo. En primer lugar, tras un ayuno de 12 h pero con acceso libre a agua, los animales se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano 2-3% (Forane®, Abbott) y se posicionaron “decúbito supino” para acceder a la cavidad peritoneal. A continuación, se aisló y cerró momentáneamente el conducto hepático con ayuda de una pinza bulldog y se realizó una ligadura en la parte distal del colédoco. Seguidamente, se hizo una incisión mínima en dicho conducto para introducir una cánula de 0,6 mm de diámetro (Braun), a través de la cual se perfundió retrógradamente una solución de taurocolato sódico (NaTc) al 5% (0,1 ml/100 g peso corporal) con ayuda de una bomba de perfusión (Bio-Rad) programada para flujo constante de 0,03 ml/min. Una vez perfundido el NaTc, se retiró la cánula y la pinza bulldog. La recogida de muestras se realizó 6 h después de la infusión de NaTc.

### **A3. SHAM salino**

Animales sometidos al mismo proceso quirúrgico que el grupo experimental A2 pero en este caso se les perfundió solución salina estéril 0,9 %.

### **A4. Pancreatitis aguda inducida por obstrucción del conducto biliopancreático (PA-OBP)**

En primer lugar, tras un ayuno de 12 h pero con acceso libre a agua, los animales se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano 2-3% (Forane<sup>®</sup>, Abbott) y se posicionaron “decúbito supino” para acceder a la cavidad peritoneal. Seguidamente, se aisló el colédoco y se practicó una ligadura en su extremo más distal, próximo a la desembocadura de dicho conducto en el duodeno. Dentro de este grupo se establecieron dos subgrupos experimentales, en función del tiempo transcurrido entre la obstrucción del colédoco y la recogida de las muestras: OBP 3 h y OBP 12 h.

### **A5. SHAM**

Animales sometidos al mismo proceso quirúrgico que el grupo experimental A4 pero en este caso no se realizó la ligadura del conducto biliopancreático. Las muestras se recogieron a las 3 h y 12 h.

### **A6. Pancreatitis aguda inducida por obstrucción del conducto biliopancreático - TAK-242**

Animales sometidos a PA-OBP que además recibieron un tratamiento con Etil-(6R)-6-[N-(2-cloro-4-fluorofenil)sulfamoil]ciclohex-1-eno-1-carboxilato (TAK-242) (Selleckchem) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 50 mg/ml y, posteriormente, diluido en solución salina para su administración intraperitoneal a una dosis de 3mg/kg peso corporal nada más inducir PA-OBP. La concentración máxima de DMSO administrada al animal fue del 4%. Las muestras se recogieron a las 12 h de OBP.

### **A7. SHAM - TAK-242**

Animales manipulados quirúrgicamente como el grupo experimental A5 que recibieron un tratamiento con TAK-242 disuelto en DMSO a una concentración de 50



mg/ml y, posteriormente, diluido en solución salina para su administración intraperitoneal a una dosis de 3 mg/kg peso. La concentración máxima de DMSO administrada al animal fue del 4%. Las muestras se recogieron a las 12 h de OBP.

#### **A8. Pancreatitis aguda inducida por obstrucción del conducto biliopancreático - 15d-PGJ2**

Animales sometidos a PA-OBP que además recibieron un tratamiento con 15d-PGJ2 (Calbiochem) disuelto en DMSO a una concentración de 25 mg/ml y, posteriormente, diluido en solución salina para su administración intraperitoneal a una dosis de 1 mg/kg peso corporal tras inducir PA-OBP. La concentración máxima de DMSO administrada al animal fue del 4%. Las muestras se recogieron a las 12 h de OBP.

#### **A9. SHAM - 15d-PGJ2**

Animales sometidos al mismo proceso quirúrgico que el grupo experimental A5 que recibieron un tratamiento con 15d-PGJ2 disuelto en DMSO a una concentración de 25 mg/ml y, posteriormente, diluido en solución salina para su administración intraperitoneal a una dosis de 1 mg/kg peso corporal. La concentración máxima de DMSO administrada al animal fue del 4%. Las muestras se recogieron a las 12 h de OBP.

Finalmente, y en todos los grupos experimentales (A2 – A9), se procedió a la sutura de la herida provocada en la cavidad peritoneal con seda 3/0, y se trató la zona manipulada quirúrgicamente con Veterín-Tenicol (Intervet S.A.). Durante el postoperatorio, los animales recibieron analgesia con buprenorfina (0,2 mg/kg) por vía intramuscular. Los animales se colocaron en sus jaulas donde recuperaron la consciencia de forma casi inmediata.

## **2. RECOGIDA DE MUESTRAS**

Tras anestesiarse al animal con pentobarbital sódico (1 mg/100 g peso corporal) administrado por vía intraperitoneal, se recogieron las siguientes muestras biológicas:

- Sangre y plasma: la sangre se extrajo mediante jeringas previamente heparinizadas (Hospira) por punción cardíaca. A continuación, se procedió a la

medida del hematocrito y seguidamente, a la obtención del plasma mediante centrifugación a 1400 g durante 10 min a 4°C. Una vez obtenido, el plasma se almacenó a -80°C hasta su uso.

- Fluido ascítico: se obtuvo de la cavidad peritoneal por aspiración con jeringas en condiciones estériles. A continuación se centrifugó a 2.500 g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su uso.

- Tejido pancreático y tejido adiposo peripancreático. Ambos se lavaron inmediatamente en solución salina 0,9% a 4°C y se retiraron los nódulos linfáticos presentes en el tejido pancreático. En el tejido adiposo peripancreático se separaron los focos necróticos del resto de tejido (áreas no necróticas), y se almacenaron por separado a -80°C hasta su uso.

### **3. PARÁMETROS DE DIAGNÓSTICO DE PANCREATITIS AGUDA**

#### **3.1. Hematocrito**

Una vez extraída la sangre con jeringas heparinizadas, se procedió al llenado de capilares de microhematocrito y se centrifugaron a 4000 g durante 6 min en una centrífuga de hematocrito (GRI-CEL). Posteriormente, se procedió a la lectura del hematocrito y los resultados se expresaron como porcentaje de células sanguíneas en sangre total.

#### **3.2. Actividad amilasa en plasma y en ascitis**

La actividad de la enzima amilasa en plasma y en fluido ascítico se determinó mediante la técnica de Noelting y Bernfeld (1948), modificada por Hickson (1970). Esta técnica consiste en la medida de la capacidad de la enzima amilasa para hidrolizar el almidón mediante la cuantificación colorimétrica de la maltosa liberada. Los resultados se expresaron en U/dl.

##### **➤ Reactivos y soluciones**

- Solución amortiguadora fosfato 20 mM, pH 7,05:
  - Fosfato sódico dibásico anhidro (Merck)
  - Fosfato sódico monobásico anhidro (Merck)
  - 6,7 mM cloruro sódico (NaCl) (Panreac)

- Reactivo de Maltosa:
  - 17 mM Ácido 3,5 nitrosalicílico (Fluka)
  - 2 N Hidróxido potásico (Probus)
  - 400 mM Tartrato potásico (Merck)
- Maltosa (Sigma)
- Almidón (Panreac)

➤ **Método**

Se añadieron 100  $\mu$ l de plasma o 50  $\mu$ l de ascitis a una solución de almidón al 2% en solución amortiguadora fosfato 20 mM, pH 7,05. La mezcla se incubó durante 5 min en un baño a 38°C para permitir la reacción de la enzima sobre el almidón y la liberación de la maltosa. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 0,5 ml de la mezcla anterior a 2,5 ml de reactivo de maltosa, se hirvió durante 10 min al baño maría, y se dejó enfriar. A continuación se tomaron 0,5 ml y se diluyeron en 5 ml de agua destilada para medir la densidad óptica a una longitud de onda de 520 nm en un espectrofotómetro (Helios Gamma y Delta), frente a un blanco de solución amortiguadora fosfato 20 mM, NaCl 6,7 mM, pH 7,05, sometido a las mismas condiciones de reacción.

A los valores de densidad óptica obtenidos en las muestras se les restó el valor de un tubo sustrato de almidón 2% sometido a la misma reacción enzimática y cuya absorbancia corresponde a la maltosa liberada de la solución de almidón de forma espontánea.

Los datos obtenidos se compararon con los de una recta patrón realizada previamente con soluciones de maltosa de concentraciones conocidas comprendidas entre 0,5 y 8 mg/ml, preparadas en solución amortiguadora fosfato 20 mM, pH 7,05.

### 3.3. Actividad lipasa en plasma y en ascitis

La actividad de la enzima lipasa se determinó en plasma y en fluido ascítico usando un kit comercial (Randox) basado en la medida del descenso de la turbidez de la mezcla por la acción de la enzima lipasa sobre la trioleína.



➤ **Método**

Tras mezclar 50 µl de muestra con 200 µl de reactivo sustrato, se midió el incremento de densidad óptica (D.O.) durante 5 min a una longitud de onda de 340 nm. Los resultados, expresados en U/l, se obtuvieron tras multiplicar el incremento de densidad óptica de cada muestra por un factor obtenido utilizando un estándar de actividad lipasa conocida y específica de cada kit, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Actividad del estándar}}{\Delta\text{D.O. Estándar}}$$

### **3.4. IL-1β en plasma**

La concentración plasmática de IL-1β se determinó mediante la técnica de ELISA utilizando un kit comercial (eBioscience). En esta reacción primero se produce la unión de las moléculas de IL-1β presentes en el plasma a su correspondiente anticuerpo monoclonal anti-IL-1β, anclado en los pocillos de la placa de ELISA. Seguidamente tiene lugar la unión, a este complejo, de un segundo anticuerpo que lleva unida una molécula de biotina a la que se unirá la avidina asociada a una molécula de la enzima peroxidasa, de manera que la adición posterior de su sustrato desencadena una reacción colorimétrica de intensidad directamente proporcional a la concentración de IL-1β presente en la muestra. Tras detener la reacción con una solución STOP, se mide la intensidad del color a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas (UVM340).

Cada día, se realizó una recta patrón con soluciones de concentraciones conocidas de IL-1β como referencia para extrapolar los resultados, que se expresaron en pg/ml.

### **3.5. Porcentaje de fluido en páncreas**

El tejido pancreático se pesó para conocer su peso fresco y a continuación se procedió a su deshidratación en un horno (Heraeus) a 100°C durante 72 h. El porcentaje de peso seco se calculó sobre el peso fresco ya estimado (considerado como el 100%), y el valor del porcentaje de fluido en páncreas se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de fluido (\%)} = 100 - (\text{Peso seco} \times 100) / \text{Peso fresco}$$

### 3.6. Actividad de la enzima mieloperoxidasa en tejido pancreático y adiposo

Para valorar la infiltración de neutrófilos en los tejidos pancreático y adiposo se determinó la actividad de la enzima MPO, según una modificación de la técnica descrita por Bhatia *et al.* (1998). Dicho método se basa en la cuantificación espectrofotométrica del producto de la reacción de MPO sobre el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

#### ➤ Reactivos y soluciones

- Solución amortiguadora fosfato 20 mM, pH 7,4 formada a partir de la mezcla de fosfato sódico mono- y di-básico (Merck)
- Solución amortiguadora fosfato 50 mM, pH 6,0 formada a partir de la mezcla de fosfato sódico mono- y di-básico (Merck)
- HDTAB (hexadeciltrimetilamonibromuro) (Sigma)
- Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) (Merck)
- TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) (Sigma)

#### ➤ Método

A las muestras de tejido, almacenadas a  $-80^{\circ}C$ , se les añadió 1 ml de tampón fosfato 20 mM, pH 7,4. Una vez descongelado, el tejido se cortó finamente con tijeras y se homogeneizó con un homogeneizador eléctrico (Heidolph Diax 600) a 20.500 rpm durante 20 s, manteniendo la muestra en hielo. El homogenado resultante se centrifugó a 10.000 g durante 10 min y a  $4^{\circ}C$  en una microcentrífuga (Eppendorf miniSpin-plus). Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 1 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 6,0 conteniendo HDTAB al 5% y se sometió a cuatro ciclos consecutivos de congelación y descongelación. Después de la última descongelación, se homogeneizó la muestra a 24.000 rpm durante 20 s y, en las muestras de tejido adiposo, se realizó una incubación adicional a  $60^{\circ}C$  durante 2 h. A continuación, la muestra se centrifugó a 10.000 g durante 5 min a  $4^{\circ}C$ . El sobrenadante resultante se diluyó en tampón fosfato 50 mM, pH 6,0 conteniendo HDTAB al 5% y se incubó con TMB, sustrato de la MPO, durante 110 s, en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras parar la reacción añadiendo  $H_2SO_4$  180 mM, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro (Helios Gamma y Delta). A los resultados obtenidos se les restó el valor de un blanco que se

obtuvo incubando TMB con el tampón fosfato utilizado para diluir las muestras y procesado en las mismas condiciones.

Los resultados de la actividad MPO en tejido pancreático se expresaron como mU MPO/mg proteína.

En el caso del tejido adiposo, los resultados se expresaron como mU MPO/mg tejido. Las mU se calcularon a partir de la definición de actividad enzimática, y utilizando el coeficiente de extinción molar del TMB.

## **4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS LIPÍDICAS**

### **4.1. Extracción de lípidos de tejido adiposo peripancreático**

El tejido adiposo peripancreático de ratas control y de ratas con PA inducida con NaTc 5% (6 h) se homogeneizó a 20.500 rpm durante 30 s en una solución fosfato (PBS) pH 7,4. A continuación, se realizó una extracción de lípidos totales siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959) adaptado para nuestras muestras, en el cual se usó una mezcla de cloroformo/metanol/agua (2:2:1), seguido de una centrifugación a 1.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los solventes presentes en la fase orgánica se evaporaron hasta la sequedad de la muestra bajo corriente de nitrógeno. A continuación, la muestra obtenida se pesó y se resuspendió en etanol y se almacenó a -20°C hasta su uso para: analizar la composición lipídica, obtener las fracciones de ácidos grasos y fosfolípidos y realizar estudios de la respuesta inflamatoria en acinos pancreáticos.

#### **4.1.1. Análisis de la composición**

La composición lipídica de la muestra se analizó mediante espectrometría de masas usando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución – espectrometría de masas (HPLC-MS). Este equipo consiste en un sistema 2795 Waters Alliance conectado a un Waters ZQ4000 (Milford, MA) operado por ionización por electrospray en modo negativo para la detección de ácidos grasos o en modo positivo para la determinación de FLs. Se hizo un barrido completo y se adquirieron espectros desde 150 hasta 1.000 m/z. La columna analítica fue C8 Ascentis express de 2,7  $\mu$ M (Supelco, Bellefonte, PA, USA) y las fases móviles fueron: fase A, H<sub>2</sub>O/HCOOH (0,1% v/v) y fase B, acetonitrilo (AcN). Se realizó un gradiente lineal desde un 30% de la fase B hasta un 100% de fase B con la columna calentada a 30°C y los

compuestos se identificaron en base a los valores de sus masas. La cuantificación se obtuvo mediante calibración externa de acuerdo al área de cada pico presente en el cromatograma y al tiempo de retención (TR) determinado gracias a los estándares apropiados (Sigma). Los cromatogramas se construyeron usando el software Masslynx (Waters, Milford, MA, USA). Todos los análisis de espectrometría de masas fueron realizados por el servicio de espectrometría de masas de la Universidad de Salamanca.

Para analizar la composición de ácidos grasos (AGs), se evaluaron los que se muestran en la Tabla 3:

**Tabla 3. Ácidos grasos analizados por espectrometría de masas**

Ácido Graso		m/z	Tiempo retención (min)
Ac. Láurico	(12:0)	199	8,12
Ac. Mirístico	(14:0)	227	9,45
Ac. Palmítico	(16:0)	255	10,93
Ac. Palmitoleico	(16:1)	253	10,01
Ac. Estearico	(18:0)	283	12,07
Ac. Oleico	(18:1)	281	11,15
Ac. Linoleico	(18:2)	279	10,34
Ac. Linolénico	(18:3)	277	9,79
Ac. Gadoleico	(20:1)	309	12,30
Ac. Eicosadienoico	(20:2)	307	11,53
Ac. Dihomo-gamma-linolénico	(20:3)	305	10,91
Ac. Araquidónico	(20:4)	303	10,35
Ac. Adrénico	(22:4)	331	11,23
Ác. Docosahexaenoico	(22:6)	327	11,06

Como derivados clorados de AGs, se analizaron las siguientes clorhidrinas (Tabla 4):

**Tabla 4. Clorhidrinas de ácidos grasos analizados por espectrometría de masas**

Clorhidrina	m/z	Tiempo retención (min)
16:1 ClOH	305	7,57
18:1 ClOH	333	8,82
18:2 ClOH	331	8,21
18:2 2ClOH	383	6,60
20:1 ClOH	361	11,24

Los FLs se agruparon en los tres tipos estructurales predominantes de acuerdo a su estructura química y fueron cuantificados como sigue: fosfatidilcolina (FC) (TR 6,0–7,2 min), fosfatidiletanolamina (FE) (TR 7,6–8,5) y fosfatidilserina (FS) (TR 11,0–12,9 min).

#### **4.1.2. Obtención de la fracción de ácidos grasos y de fosfolípidos**

El extracto lipídico obtenido de ratas control se disolvió en PBS, se sonicó para formar micelas y se incubó con  $\text{CaCl}_2$  (0,735 mM) y lipasa (3000 U/L) durante 1 h a 37°C en agitación para liberar los ácidos grasos presentes en los TGs. Tras eliminar todos los solventes en un rotavapor hasta la sequedad, la muestra se resuspendió en una mezcla de cloroformo/ácido acético (100:1). A continuación, la muestra se pasó por una columna C18 de sílice de fase reversa Sep-Pak, la cual se eluyó con cloroformo/ácido acético (100:1) para recoger una primera fracción que contenía los ácidos grasos. Finalmente, se añadió a la columna metanol/cloroformo (2:1) seguido de metanol/cloroformo/agua (2:1:0,8), para eluir la fracción de FLs. A continuación, se evaporaron los solventes orgánicos hasta la sequedad bajo corriente de nitrógeno y la muestra se recogió en etanol.

#### **4.2. Cloración de ácidos grasos**

El proceso de cloración se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Winterbourn *et al.* (1992), ligeramente modificado.

El análisis de espectrometría de masas de la fracción de ácidos grasos obtenida de tejido adiposo peripancreático de ratas control reveló una pureza  $\geq 99\%$ , por lo que se procedió a llevar a cabo la reacción de cloración de la misma. También se cloraron los ácidos grasos insaturados palmitoleico, oleico, linoleico, gadoleico y araquidónico (Sigma).

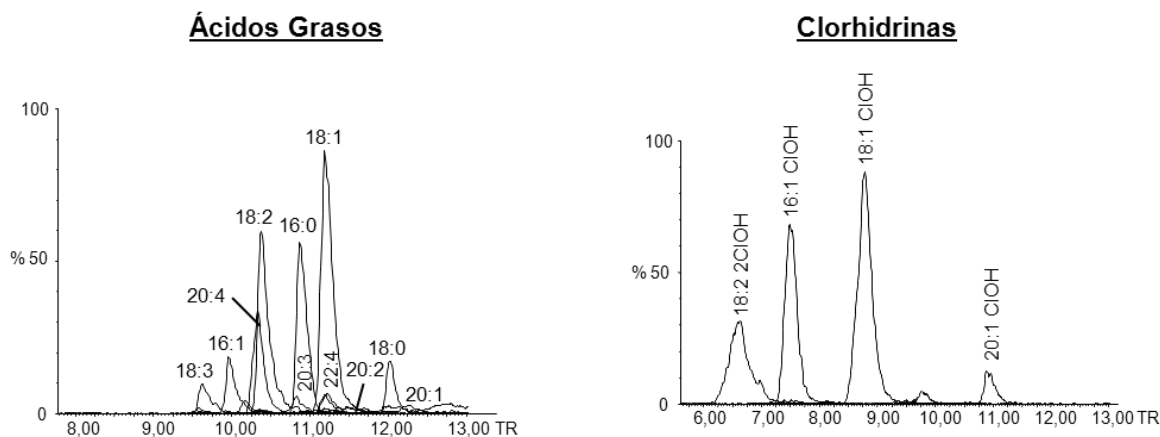
Para llevar a cabo la reacción de cloración de ácidos grasos se separaron dos alícuotas idénticas de la misma muestra, de las cuales una de ellas se utilizó como control y la otra se sometió a cloración. Tras añadir el mismo volumen de PBS pH 7,4 que de muestra lipídica, se sonicó durante 15 minutos a 35°C y a continuación se añadió hipoclorito sódico ( $\text{NaOCl}$ ) pH 6 en proporción 10:1 (en exceso de mmoles) a la alícuota que se sometió a cloración y el mismo volumen de agua a la alícuota control. La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y agitación.



Finalmente, se realizó una extracción siguiendo el método de Bligh y Dyer usando una mezcla cloroformo/metanol/agua (2:2:1), se evaporaron los solventes orgánicos hasta la sequedad de la muestra bajo corriente de nitrógeno y se resuspendió en etanol.

La muestra resultante se analizó por HPLC-MS como se ha descrito previamente, considerándose clorhidrinas aquellos compuestos clorados que incorporaron un átomo de cloro y un grupo hidroxilo (-OH) por cada insaturación, descartando aquellos otros compuestos que incorporaron más de un átomo de cloro por cada doble enlace. Para la identificación de clorhidrinas en la fracción de ácidos grasos, se utilizaron los estándares de cada AG sometido al mismo proceso de cloración.

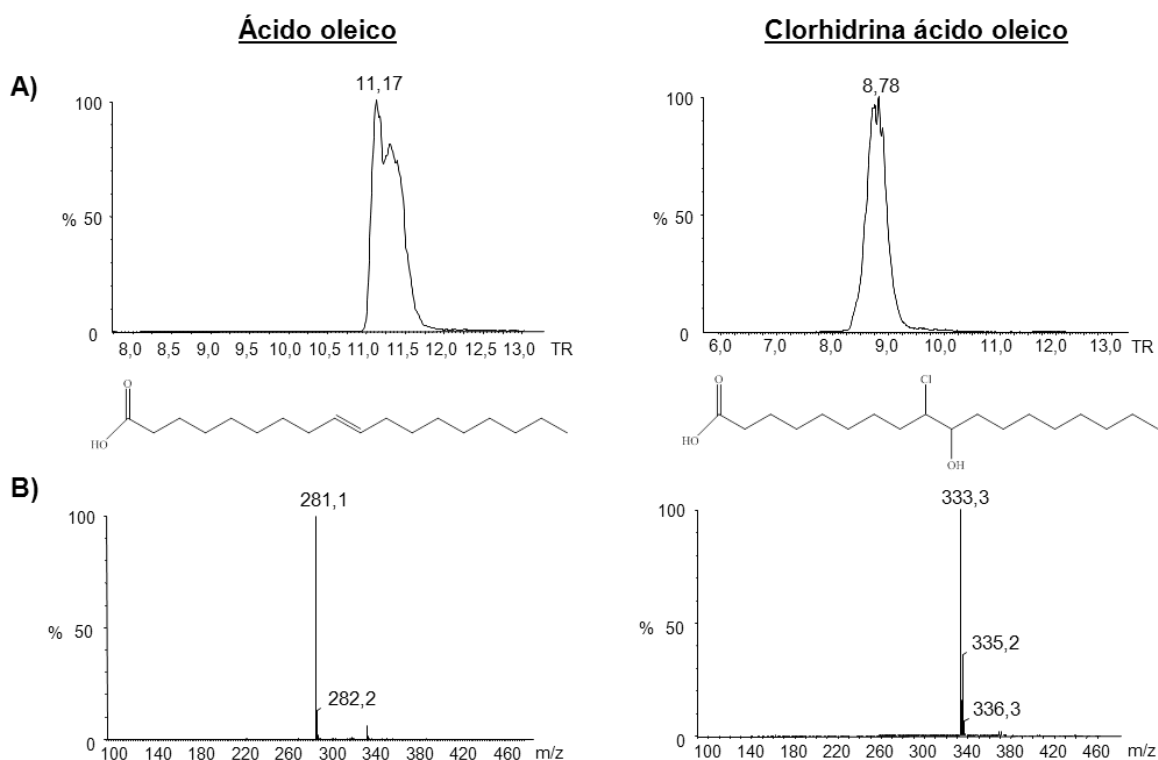
La eficiencia de la reacción de cloración de la fracción de ácidos grasos resultó del 100%, obteniéndose un 85% de clorhidrinas, siendo las mayoritarias las del ácido oleico y linoleico (Figura 4). El 15% restante se corresponde con la formación de otros derivados clorados de ácidos grasos (ácidos grasos en los que se insertaron dos cloros en la misma insaturación).



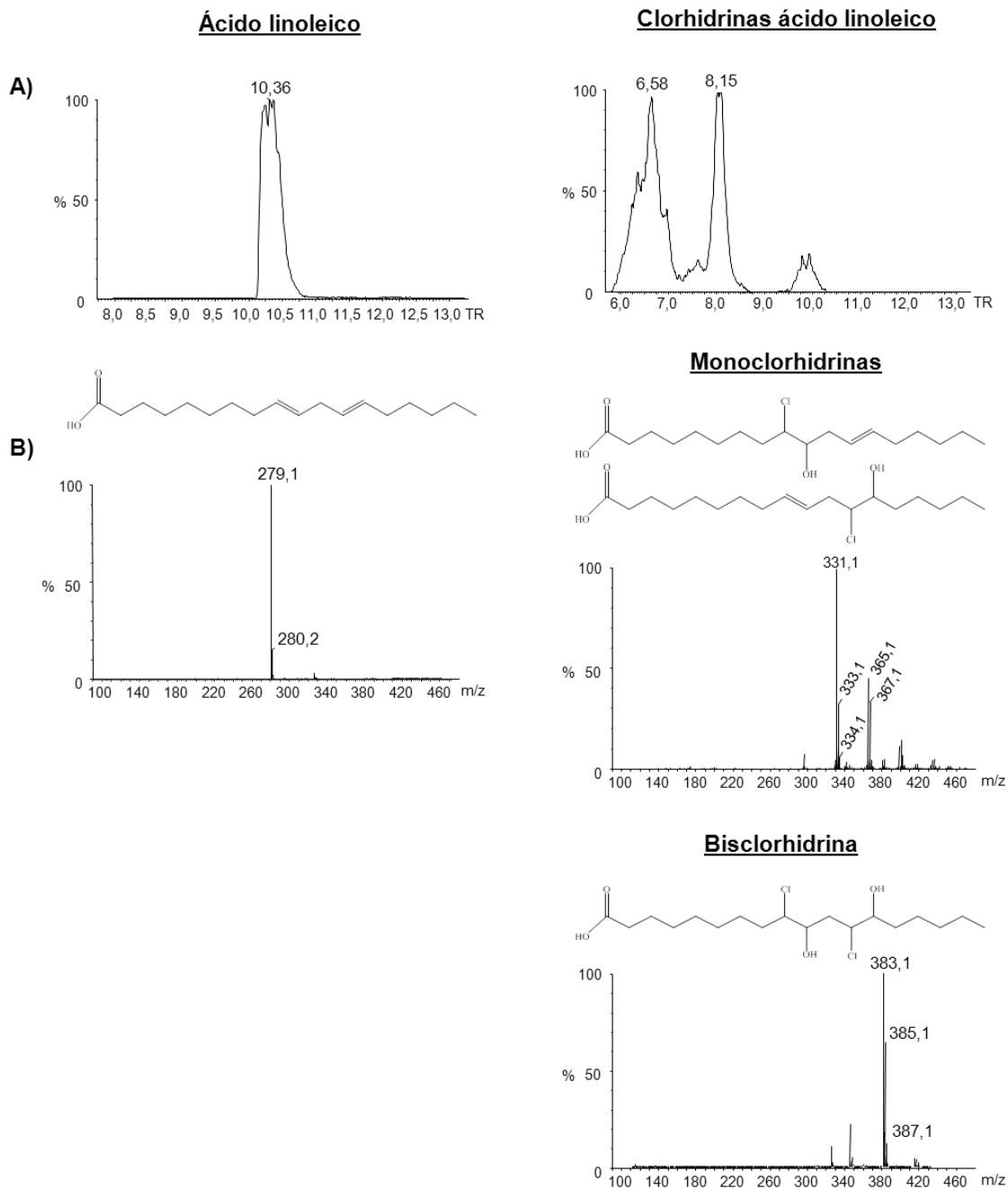
**Figura 4. Identificación por HPLC-MS de los ácidos grasos y clorhidrinas de ácidos grasos presentes en la fracción de ácidos grasos de tejido adiposo peripancreático de ratas control.** Se muestran cromatogramas representativos que reflejan el tiempo de retención (TR) y la abundancia relativa (área de cada pico) de cada ácido graso o clorhidrina.

Los siguientes cromatogramas y espectros muestran los resultados del análisis por HPLC-MS de los compuestos clorados obtenidos a partir de los diferentes ácidos grasos insaturados utilizados para valorar la respuesta inflamatoria acinar: ácido oleico (Figura 5), linoleico (Figura 6) y araquidónico (Figura 7).

El rendimiento de la reacción de cloración de los ácidos grasos oleico y linoleico fue de aproximadamente el 100%, no detectándose producto de partida. La formación de clorhidrinas del ácido oleico ( $m/z = 333,3$ ) fue del 87%, siendo tan solo de un 13% el porcentaje correspondiente a otros productos diclorados. Sin embargo, la formación de clorhidrinas de ácido linoleico fue de aproximadamente el 75%, correspondiéndose el 25% restante a la formación de productos diclorados, que incorporaron dos cloros en la misma insaturación. En el caso del ácido linoleico se obtuvieron dos compuestos halogenados: las formas mono- ( $m/z = 331,1$ ) y bisclorhidrina ( $m/z = 383,1$ ), en porcentajes del 8,64% y 65,8%, respectivamente. Para ambos ácidos grasos, las clorhidrinas presentaron un menor TR que su correspondiente AG sin clorar, confirmando una mayor polaridad del producto obtenido.



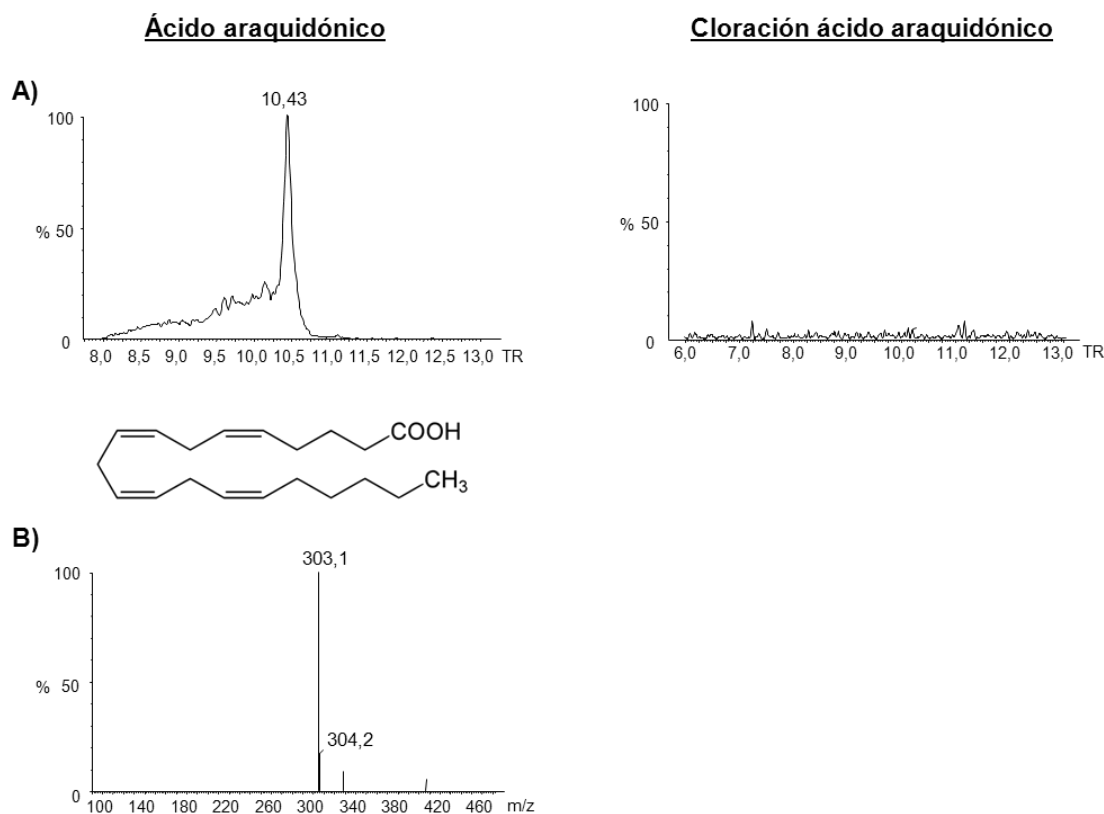
**Figura 5. Análisis por HPLC-MS del proceso de cloración del ácido oleico.** Se muestran cromatogramas (A) representativos que reflejan el tiempo de retención (TR) y la abundancia relativa (área de cada pico) de cada compuesto y espectros de masas (B) representativos que muestran el ratio masa/carga ( $m/z$ ) del ácido oleico o su clorhidrina.



**Figura 6. Análisis por HPLC-MS del proceso de cloración del ácido linoleico.** Se muestran cromatogramas (A) representativos que reflejan el tiempo de retención (TR) y la abundancia relativa (área de cada pico) de cada compuesto y espectros de masas (B) representativos que muestran el ratio masa/carga (m/z) del ácido linoleico o sus clorhidrinas.

En el análisis de la cloración del ácido araquidónico (Figura 7) se obtuvo un cromatograma en el que no apareció ningún compuesto predominante. Por el contrario, se obtuvieron numerosos fragmentos de peso molecular muy diverso, pero todos ellos de masa inferior a la de dicho ácido graso. Para determinar si la

fragmentación se debía a un elevado tiempo de reacción, también se realizó la reacción de cloración durante 15 y 30 min, obteniendo el mismo resultado. Por ello, interpretamos que el ácido araquidónico se fragmenta durante la reacción de cloración. Así, los experimentos para valorar la respuesta inflamatoria a este AG se realizaron únicamente con el ácido araquidónico sin modificar.



**Figura 7. Análisis por HPLC-MS del proceso de cloración del ácido araquidónico.** Se muestran cromatogramas (A) representativos que reflejan el tiempo de retención (TR) y la abundancia relativa (área de cada pico) de cada compuesto y espectros de masas (B) representativos que muestran el ratio masa/carga (m/z) del ácido araquidónico.

### 4.3. Transesterificación de fosfolípidos

El análisis por espectrometría de masas de la fracción de FLs reveló una pureza  $\geq 99\%$ , por lo que se procedió a analizar la composición de ácidos grasos mediante una reacción de transesterificación, que consiste en la reacción de los FLs con metanol en presencia de un catalizador (ácido sulfúrico) para obtener ésteres metílicos y glicerina.

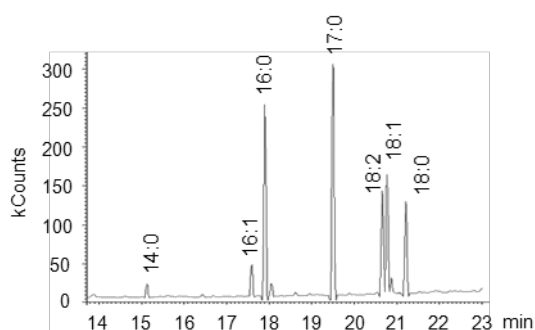
Para ello, se añadió a la fracción de FLs 1 ml de ácido sulfúrico 2,5% (vol/vol) en metanol conteniendo el ácido heptadecanoico (17:0) como patrón interno. A

continuación, la mezcla de reacción se incubó durante 90 min a 80 °C, evitando la evaporación de los solventes. Tras la adición de hexano:agua (1:3), se centrifugó a 2.500 rpm durante 5 min para separar dos fases, una acuosa y una orgánica, donde se recogieron los ésteres metílicos de ácidos grasos.

El análisis de los productos resultantes se llevó a cabo por cromatografía de gases (GC), en un cromatógrafo Agilent 7890A con un espectrómetro de masas Agilent MS220, empleando una columna Agilent VF5 de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro externo y 0,25 m de espesor de capa. Como gas portador se utilizó helio y la detección se hizo por impacto electrónico. El programa de temperaturas fue: 5 min a 90°C, seguidamente se subió hasta los 190°C a 12°C/min y, por último, hasta 290°C a 4°C/min. El tiempo total fue de 38,33 min y se inyectó un volumen total de 1 µl con relación de *Split* 20:1. La cuantificación se obtuvo mediante calibración externa de acuerdo al área de cada pico presente en el cromatograma y al TR determinado gracias a los estándares apropiados (Sigma). Los cromatogramas se construyeron usando el software MS Workstation 7.0.1.

Tras los análisis de los productos resultantes de la reacción de transesterificación de la fracción de FLs (Figura 8 y Tabla 5), se observó que los ácidos grasos mayoritarios eran el ácido palmítico, como AG saturado, y el ácido oleico, como AG insaturado. Además, el estudio realizado por HPLC-MS determinó que el grupo polar mayoritario era el de las colinas

Por ello, el estudio espectrométrico de la fracción de FLs reveló que el fosfolípido 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) es el más representativo de la muestra.



**Figura 8. Análisis de los ácidos grasos presentes en la fracción de fosfolípidos de tejido adiposo.** Se muestra un cromatograma representativo del análisis por GC-MS con los diferentes tiempos de retención de cada ácido graso.

**Tabla 5. Composición relativa de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de tejido adiposo**

	Ácido Graso	%
Ac. Mirístico	(14:0)	3,47 ± 0,24
Ac. Palmítico	(16:0)	32,44 ± 0,14
Ac. Palmitoleico	(16:1)	6,10 ± 0,04
Ac. Esteárico	(18:0)	16,36 ± 0,17
Ac. Oleico	(18:1)	22,74 ± 0,13
Ac. Linoleico	(18:2)	18,71 ± 0,20

Los valores representan medias ± SEM.

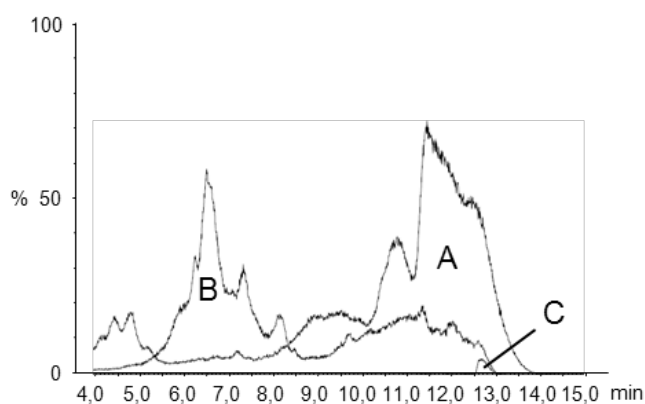
#### 4.4. Oxidación de fosfolípidos

La oxidación de FLs se llevó a cabo con oxígeno atmosférico a tiempos comprendidos entre 48 h y 120 h.

El resultado de la oxidación se analizó mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS), un método que permite distinguir entre la composición de dos compuestos de igual masa, identificando así los FLs oxidados. El protocolo seguido fue el mismo que el descrito anteriormente para el análisis mediante HPLC, pero en un cromatógrafo HPLC Agilent 1100 con un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-TOF QSTAR XL (Applied Bio systems).

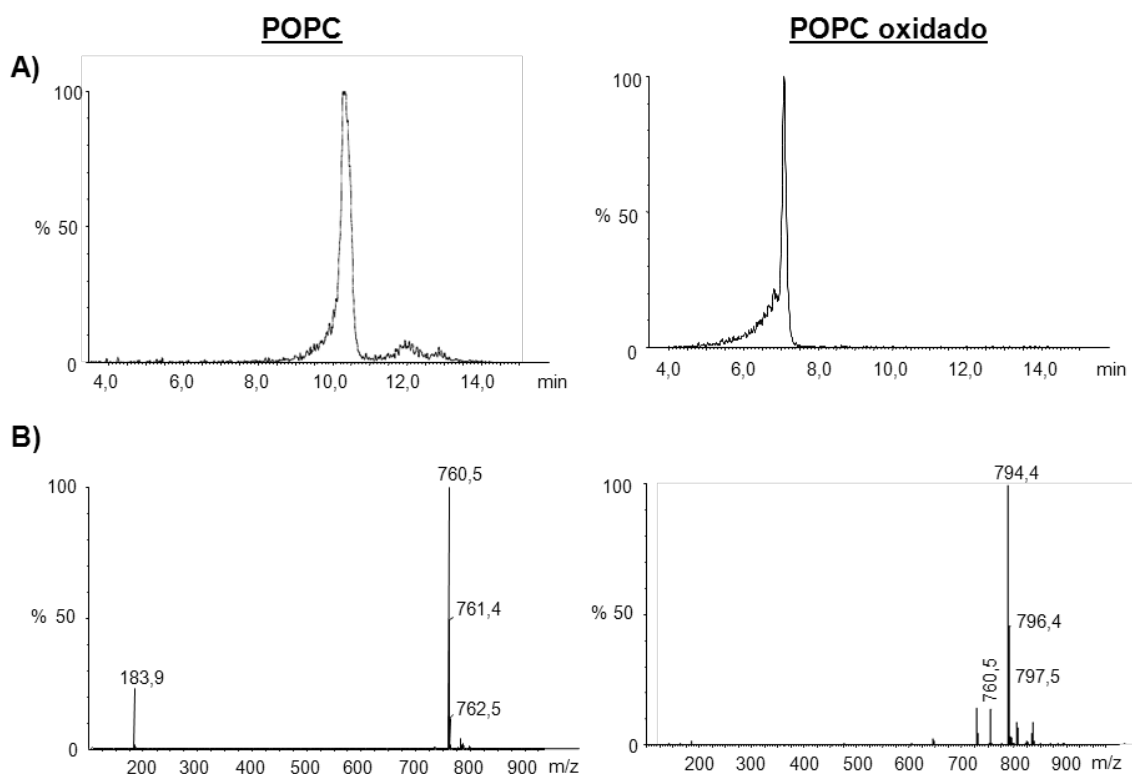
En el análisis espectrométrico de los productos de oxidación de la fracción de FLs obtenida de tejido adiposo peripancreático de ratas control, se observaron numerosos productos de masas moleculares muy pequeñas, muy alejadas de la esperada, que contenían los grupos polares de FLs (colinas, serinas, etanolaminas), indicando la fragmentación de los FLs. Por ello, se eligió POPC, para llevar a cabo los experimentos posteriores, tanto en su forma nativa, como oxidada.

En la Figura 9 puede observarse cómo la oxidación avanzó con el tiempo, pasando de un 20% de oxidación a las 48 horas (A), a prácticamente el 100% a las 120 horas (B). También se observó una pequeña cantidad del material de partida que permaneció sin oxidar (C). Por ello, se eligió el tiempo de 120 h como el óptimo para llevar a cabo la oxidación de todas las moléculas de POPC. Los compuestos obtenidos a las 120 h presentaron un menor tiempo de retención que POPC sin oxidar y que los compuestos detectados a las 48 h, indicando una mayor polaridad.



**Figura 9. Análisis por TOF-MS del proceso de oxidación de POPC.** Se muestra un cromatograma representativo que refleja el tiempo de retención y la abundancia relativa (área de cada pico) del resultado de la oxidación a 48 h (A) y 120 h (B), y de POPC sin oxidar (C).

En la Figura 10 se muestran cromatogramas (A) y espectros de masas (B) de POPC sin oxidar y tras la oxidación. El tiempo de retención y la masa del producto resultante tras la oxidación indicaron una mayor polaridad y la incorporación de dos átomos de oxígeno.



**Figura 10. Análisis de espectrometría de masas del proceso de oxidación de POPC.** Se muestran cromatogramas (A) representativos que reflejan el tiempo de retención (TR) y la abundancia relativa (área de cada pico) de cada compuesto y espectros de masas (B) representativos que muestran el ratio masa/carga (m/z) de POPC o POPC oxidado.

## 5. AISLAMIENTO Y CULTIVOS DE ACINOS PANCREÁTICOS

### 5.1. Aislamiento

#### ➤ Reactivos y soluciones

- Solución de aislamiento:
  - 25 mM HEPES (Sigma)
  - 2,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck)
  - 100 mM NaCl (Merck)
  - 5,7 mM KCl (Merck)
  - 1 % (v/v) Vitaminas esenciales (Merck)
  - 1,2 mM  $\text{MgCl}_2$  (Merck)

- 11,5 mM Glucosa (Merck)
- 2 mM Glutamina (Sigma)
- 5 mM Piruvato (Sigma)
- 5 mM Glutamato (Sigma)
- 6 mM Fumarato (Sigma)
- 0,01% (p/v) Inhibidor de tripsina (Sigma)
- 1% (v/v) Solución de aminoácidos (Sigma)

Se ajustó el pH a 7,45 con NaOH 10 N

- Solución de lavado:
  - Solución de aislamiento + 2 mM CaCl<sub>2</sub> + 0,2% Albúmina bovina
- Solución STOP:
  - Solución aislamiento + 2 mM CaCl<sub>2</sub> + 4% Albúmina bovina
- Solución de incubación:
  - Solución aislamiento + 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> + 1% Albúmina bovina

➤ **Método**

El aislamiento de acinos pancreáticos se realizó mediante la digestión del páncreas con colagenasa siguiendo el protocolo previamente descrito por Gonzalez *et al.* (1997). Para ello, tras anestesiar al animal con pentobarbital sódico (1 mg/100 gr peso corporal), se extrajo el páncreas y, tras lavarlo en solución de lavado fría, se inyectaron 5 ml de solución de lavado conteniendo colagenasa (200 U/ml) con una aguja de insulina. A continuación, se colocó el páncreas en un erlenmeyer conteniendo 10 ml de solución de lavado con colagenasa, y se incubó a 37 °C durante 10 min en un baño termostatizado (GFL 1083) con agitación (200 ciclos/min). Tras retirar el medio por decantación, se realizaron dos incubaciones más de 10 min cada una añadiendo 10 ml de solución de lavado con colagenasa en cada una de ellas. Seguidamente, se desechó el medio por decantación y se añadieron 10 ml de solución de lavado a la suspensión de células para su disgregación de forma mecánica haciendo pasar la muestra por puntas de pipeta de diámetros sucesivamente más pequeños (3, 2, y 1 mm). Tras pasar la muestra a través de una gasa para retirar los fragmentos parcialmente disgregados, el filtrado se centrifugó a



380g durante 5 min en una centrifuga refrigerada (Eppendorff 5403) a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 10 ml de solución STOP y los acinos se centrifugaron a 50 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado final se resuspendió en solución de incubación para ser usado en experimentos posteriores.

## **5.2. Cultivos**

Una vez obtenidos, los acinos pancreáticos se resuspendieron en 7,5 ml de solución de incubación, se pasaron a una placa estéril de 96 pocillos en los que se depositaron 100 µl de la suspensión celular y se dejaron en reposo durante 1 h en una estufa (Shel Lab), con atmósfera estéril y húmeda a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Seguidamente, se diseñaron pocillos para los diferentes experimentos que se detallan a continuación, los cuales se mantuvieron en la estufa durante una hora adicional.

Para valorar la respuesta inflamatoria acinar a las diferentes áreas de tejido adiposo, se realizaron cultivos celulares en presencia de etanol ≤ 1% como vehículo de los diferentes compuestos lipídicos (grupo control), o de extracto lipídico del tejido adiposo peripancreático de ratas control y de las áreas no necróticas y necróticas del tejido adiposo peripancreático de ratas con PA inducida por NaTc (5%) a concentraciones ≤ 10 mg/ml.

Con el fin de determinar si la fracción de ácidos grasos totales obtenidos de tejido adiposo peripancreático de ratas control, o si el conjunto de sus clorhidrinas obtenidas químicamente, estimulaban la respuesta inflamatoria de acinos pancreáticos, se realizaron cultivos de acinos pancreáticos de ratas control o de ratas con PA-OBP (3 h) en presencia de etanol ≤ 1% (grupo control) o de dichas fracciones a concentraciones ≤ 300 µM.

Para estudiar la contribución relativa de diferentes ácidos grasos individuales a la respuesta inflamatoria acinar, se cultivaron acinos pancreáticos en presencia de etanol ≤ 1% (grupo control) o de uno de los siguientes ácidos grasos: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico o ácido araquidónico a concentraciones ≤ 1200 µM.

De igual manera y, para analizar el efecto de las clorhidrinas de ácidos grasos, se hicieron cultivos celulares en presencia de etanol ≤ 1% (grupo control) o de clorhidrinas de ácido oleico o de ácido linoleico: ≤ 1200 µM.

También se analizaron los efectos de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) sin oxidar y oxidado sobre la respuesta inflamatoria. Para ello, se realizaron cultivos celulares de acinos pancreáticos de ratas control en presencia de etanol  $\leq 1\%$  (grupo control) o de POPC o POPC oxidado a concentraciones  $\leq 100 \mu\text{M}$ . En pocillos adicionales, se cultivaron acinos pancreáticos en presencia de NaTc 0,25% como estímulo proinflamatorio durante 45 min, antes de añadir POPC o POPC oxidado a la concentración de  $10 \mu\text{M}$  o  $50 \mu\text{M}$ .

Para valorar la implicación de MAPKs, JAK, NF- $\kappa$ B, STAT3, TLR4, PPAR $\gamma$  y eicosanoides en la respuesta inflamatoria de acinos pancreáticos a lípidos, al cultivo se añadieron los productos a las concentraciones que se detallan en la Tabla 6, o su correspondiente vehículo (DMSO  $\leq 0,3\%$ ), considerándose tiempo 0 h el momento en el que los lípidos se añadieron al cultivo celular.

**Tabla 6. Concentración y tiempo de adición a los cultivo de los diferentes inhibidores, agonistas y antagonistas**

Producto	Descripción	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Tiempo (min)
SP600125 (Sigma)	Inhibidor JNK-MAPK	50	- 45
GDC-0994 (Selleckchem)	Inhibidor ERK-MAPK	50	- 45
SB202190 (Calbiochem)	Inhibidor p38-MAPK	50	- 45
AG-490 (Sigma)	Inhibidor JAK	50	- 45
JSH-23 (Selleckchem)	Inhibidor NF- $\kappa$ B	30	- 45
SH-4-54 (Selleckchem)	Inhibidor STAT3	1	- 45
TAK-242 (Calbiochem)	Inhibidor TLR4	5	- 45
GW-9662 (Sigma)	Antagonista PPAR $\gamma$	10	-75
15d-PGJ2 (Calbiochem)	Agonista PPAR $\gamma$	10	+ 5
Celecoxib (Selleckchem)	Inhibidor Ciclooxigenasa-2	10	- 45

### 5.3. Actividad LDH

#### ➤ Reactivos y soluciones

- Solución de lisis:
  - 50 mM Tris pH 7,4 (Sigma)
  - 50 mM  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma)
  - 15 mM  $\text{MgCl}_2$  (Merck)

- 15 mM EDTA (Sigma)
- 100  $\mu$ M PMSF (Sigma)
- 1 mM DTT (Sigma)
- 150  $\mu$ g/ml digitonina (Sigma)
  
- Solución Tris/NaCl, pH 7,2:
  - 81,3 mM Tris (Sigma)
  - 203,3 mM NaCl (Merck)
  
- Solución Tris/NaCl/NADH, pH 7,2:
  - 81,3 mM Tris (Sigma)
  - 203,3 mM NaCl (Merck)
  - 0,244 mM NADH (Sigma)
  
- Solución Tris/NaCl/Piruvato, pH 7,2:
  - 81,3 mM Tris (Sigma)
  - 203,3 mM NaCl (Merck)
  - 0,244 mM piruvato (Sigma)

➤ **Método**

El daño celular se estimó mediante la determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) siguiendo el protocolo descrito por Gutmann y Wahlefel (1974). Tras el cultivo celular, se recogió el medio de incubación por centrifugación a 380 g, 4 °C durante 3 min, y se almacenó a -80 °C hasta la determinación de la actividad LDH liberada. Seguidamente, el precipitado se resuspendió en solución de lisis, se sonicó durante 30 s y, a continuación, se recogió el sobrenadante por centrifugación a 14.000 g durante 3 min a 4°C para determinar la actividad LDH del interior celular.

Para determinar la actividad LDH en los lisados celulares, se mezclaron 625  $\mu$ l de solución Tris/NaCl/NADH pH 7,2 con 125  $\mu$ l de solución Tris/NaCl/Piruvato pH 7,2 y 12,5  $\mu$ l de lisado celular.

Para la determinación de la actividad LDH en el medio de cultivo, se mezclaron 50  $\mu$ l de solución Tris/ NaCl pH 7,2, 62,5  $\mu$ l de solución Tris/NaCl/NADH pH 7,2, 12,5  $\mu$ l de Tris/NaCl/Piruvato pH 7,2 y 50  $\mu$ l de medio de cultivo.

Tras la mezcla, se midió la disminución de la absorbancia en 1 min debido a la formación de NAD<sup>+</sup> a una longitud de onda de 340 nm. La actividad LDH total se calculó sumando la LDH liberada al medio cultivo y la LDH del interior celular, para determinar el porcentaje de LDH total liberada al exterior celular.

## **6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT**

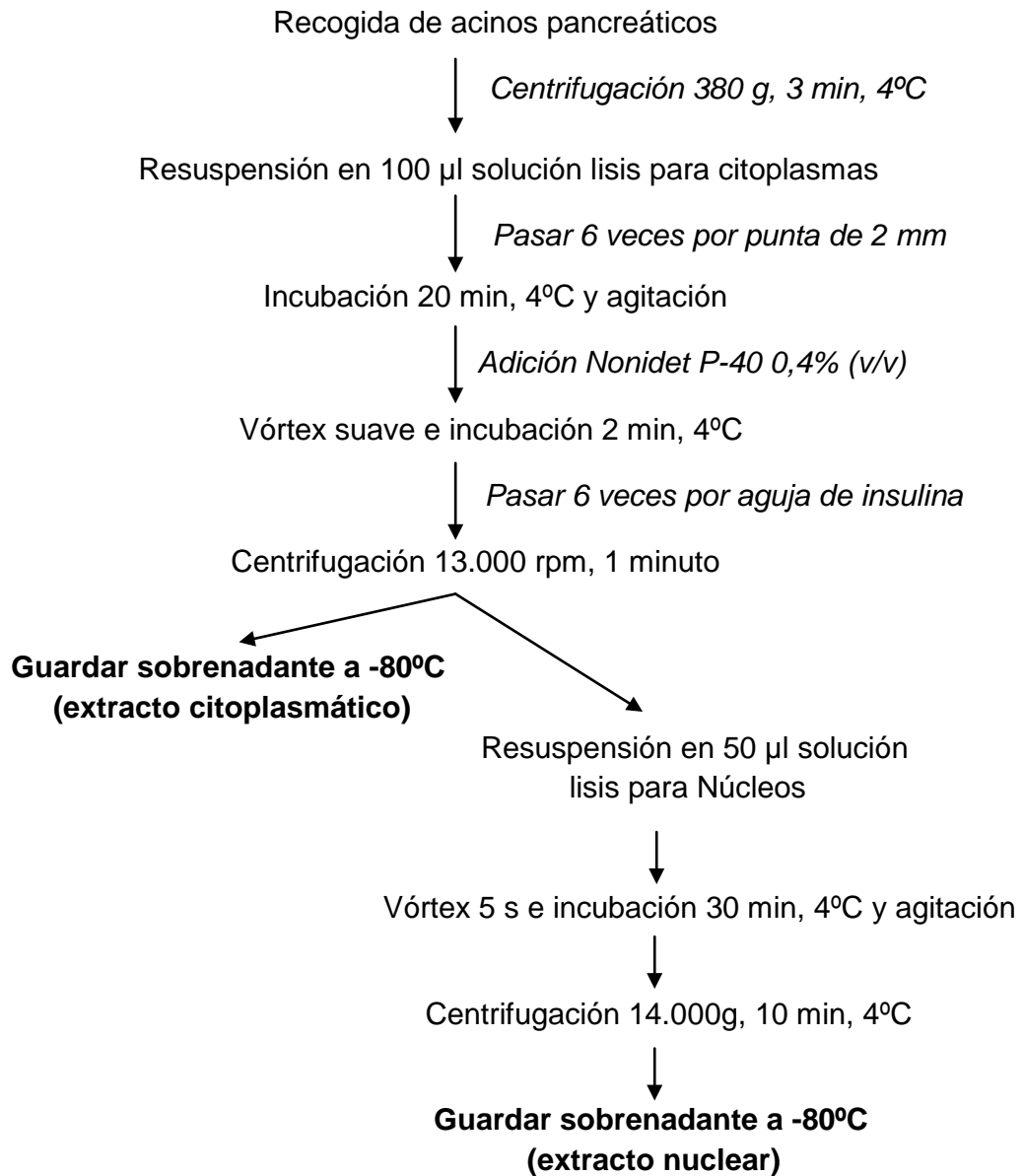
### **6.1. Obtención de extractos citoplasmáticos y nucleares**

#### **➤ Reactivos y soluciones**

- Solución de lisis para citoplasmas:
  - 10 mM HEPES pH 7,9 (Sigma)
  - 2 mM EDTA (Sigma)
  - 25 mM KCl (Merck)
  - Cóctel inhibidor de fosfatasas (Sigma)
  - Cóctel inhibidor de proteasas (Sigma)
  - 2 mM DTT (Sigma)
  
- Solución de lisis para núcleos:
  - 20 mM HEPES pH 7,9 (Sigma)
  - 1 mM EDTA (Sigma)
  - 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck)
  - 420 mM NaCl (Merck)
  - Cóctel inhibidor de fosfatasas (Sigma)
  - Cóctel inhibidor de proteasas (Sigma)
  - 0,5 mM DTT (Sigma)

➤ **Método**

Una vez finalizado el cultivo celular, los extractos citoplasmáticos y nucleares se obtuvieron siguiendo el siguiente esquema:



## 6.2. Estudio de rutas de señalización de la respuesta inflamatoria

### ➤ Reactivos y soluciones

- Tampón de electroforesis:
  - 192 mM glicina (Merck)
  - 25 mM Trizma® base (Sigma)
  - 0,1% SDS (Sigma)
  
- Tampón de transferencia:
  - 192 mM glicina (Merck)
  - 25 mM Trizma® base (Sigma)
  - 0,1% SDS (Sigma)
  - 20% etanol (Merck)
  
- Tampón de carga:
  - 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
  - 2% SDS (Sigma)
  - 10% glicerol (Merck)
  - 5% mercaptoetanol (Sigma)
  - 0,001% azul de bromofenol (Merck)
  
- Marcador de pesos moleculares *Precision Plus Protein Standard* (BioRad)
- Geles de Acrilamida 10% (Bio-Rad)
- Membranas de nitrocelulosa 0,45  $\mu$ M x 8 cm x 9 cm (Amersham Biosciences)
  
- Tampón de revelado TBS:
  - 20 mM Trizma® base (Sigma)
  - 137 mM NaCl (Panreac)Se ajustó el pH a 7,6 con HCl 37%
  
- Albúmina sérica bovina (Sigma)
  
- Solución de bloqueo:
  - TBS
  - 0,1 % (v/v) Tween-20 (Sigma)
  - 5% (p/v) leche en polvo desnatada (Sveltesse, Nestle)

- Solución del anticuerpo primario:
  - TBS
  - 0,1 % (v/v) Tween-20 (Sigma)
  - Albúmina sérica bovina 5% (p/v)
- Solución de lavado:
  - TBS
  - 0,1 % (v/v) Tween-20 (Sigma)
- Anticuerpo policlonal primario contra fosfo-SAPK/JNK obtenido en conejo (Thr183/Tyr185) (Cell Signaling Technology)
- Anticuerpo policlonal primario contra fosfo-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) obtenido en conejo (Cell Signaling Technology)
- Anticuerpo policlonal primario contra fosfo-p38-MAPK (Thr180/Tyr182) obtenido en conejo (Cell Signaling Technology)
- Anticuerpo policlonal primario contra fosfo-JAK2 (Tyr1007/Tyr1008) obtenido en conejo (Cell Signaling Technology)
- Anticuerpo policlonal primario contra I $\kappa$ B $\alpha$  (Tyr1007/Tyr1008) obtenido en conejo (Cell Signaling Technology)
- Anticuerpo monoclonal primario contra TLR4 obtenido en ratón (Abcam)
- Anticuerpo monoclonal primario contra  $\alpha$ -tubulina obtenido en ratón (Calbiochem)
- Anticuerpo monoclonal primario contra p65-NF- $\kappa$ B obtenido en conejo (Cell Signaling Technology)
- Anticuerpo policlonal primario contra fosfo-STAT3 (Tyr705) obtenido en conejo (Cell Signaling Technology)
- Anticuerpo monoclonal primario contra PPAR $\gamma$  obtenido en conejo (Abcam)
- Anticuerpo monoclonal primario contra lamina B1 obtenido en conejo (Cell Signaling Technology)
- Anticuerpo secundario obtenido en cabra contra ratón (IgG) (H + L) unido a peroxidasa de rábano (BioRad)
- Kit de detección *Phototope-HRP Detection* (Cell Signaling Technology)
  - Anticuerpo secundario contra conejo (IgG) unido a peroxidasa de rábano
  - Reactivo LumiGlo para detección por quimioluminiscencia
- Películas radiográficas Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL (Amersham Biosciences)

➤ **Método**

30 µg de proteínas de extractos citoplasmáticos o nucleares se separaron en un gel SDS-PAGE al 12% a 25 mA en tampón de electroforesis durante 90 min y, a continuación, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 2 h a 200 mA. La membrana se conservó a 4°C en un ambiente húmedo hasta su revelado.

Previamente al revelado, se bloquearon los puntos de unión inespecífica mediante la incubación de la membrana con solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. A continuación, la membrana se lavó 1 h con solución de lavado y se incubó toda la noche en agitación a 4°C con 5 ml de solución de anticuerpo primario conteniendo uno de los siguientes anticuerpos contra: cada una de las tres p-MAPKs (JNK, ERK, p38) (1:1.000), p-JAK (1:1.000), IκBα (1:1.000), TLR4 (1:1000) o α-tubulina (1:3.000), para extractos citoplasmáticos; y contra p65-NF-κB (1:1.000), p-STAT3 (1:1.000), PPAR<sub>γ</sub> (1:1000) o lamina B1 (1:1.000), para extractos nucleares. Tras tres lavados de 5 min con solución de lavado y agitación vigorosa, la membrana se incubó a temperatura ambiente con 5 ml de solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo secundario contra IgG de conejo diluido (1:2.000), o con anticuerpo secundario contra IgG de ratón (1:10.000) durante 1 h con agitación. Posteriormente, el anticuerpo no unido se eliminó mediante tres incubaciones de 5 min con solución de lavado y agitación constante. Las bandas de cada proteína se visualizaron en películas radiográficas por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial LumiGlo.

La intensidad relativa de las bandas de cada proteína se analizó mediante el software Image J 1.32 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) y se comparó con la de los correspondientes controles de carga. Los resultados se expresaron como veces de variación en comparación con acinos control.



## 7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR CUANTITATIVA (RT-qPCR)

### 7.1. Extracción del ARN total

#### ➤ Reactivos y soluciones

- RNeasy® mini kit (Qiagen)
- Agarosa amplio rango/estándar 3:1 (Sigma)
- Bromuro de etidio (Sigma)

#### ➤ Método

Se utilizó el kit comercial RNeasy® de extracción de ARN, cuya técnica se basa en la unión del ARN a membranas de silicagel de las columnas de extracción y su posterior lavado y elución con solventes adecuados.

Para la obtención de ARN, los acinos pancreáticos, previamente almacenados en nitrógeno líquido, se resuspendieron en una solución RLT con  $\beta$ -mercaptoetanol, y se homogeneizaron pasándolos por jeringas de insulina. La mezcla resultante se centrifugó a 14.000 g durante 3 min, y el sobrenadante se mezcló con etanol al 70% (v/v), justo antes de añadirlo a las columnas de extracción para seguir después el protocolo del fabricante. La obtención de ARN total se realizó en presencia de ADNasa.

La pureza y concentración de ARN se valoró midiendo la absorbancia a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. La integridad del ARN obtenido se comprobó mediante una electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1,25% conteniendo bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta las bandas correspondientes al ARN ribosómico 28S y 18S, con ayuda de un visor de geles (Gel Doc 1000/2000 image analysis system, Bio-Rad).

### 7.2. Transcripción reversa y PCR cuantitativa

#### ➤ Reactivos y soluciones

- iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad)
- iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad)

Tabla 7. *Primers* usados para la amplificación de ADNc mediante qPCR

Gen	Referencia GenBank	Secuencia nucleótidos	Longitud (pb)
<b>CCL2</b>	<b>NM_031530</b>		
Directo		5'-TAGCATCCACGTGCTGTCTC-3'	91
Reverso		5'-CCGACTCATTGGGATCATCT-3'	
<b>P-selectina</b>	<b>NM_013114</b>		
Directo		5'-TCTCCTGCAACGAGGAGTTT-3'	174
Reverso		5'-GGTGTGCGACAGGACATTGTG-3'	
<b>TLR4</b>	<b>NM_019178</b>		
Directo		5'-AGAAAATGCCAGGATGATGC-3'	95
Reverso		5'-AGGGATTCAAGCTTCCTGGT-3'	
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	<b>NM_013124</b>		
Directo		5'-AGGGCGATCTTGACAGGAAA-3'	164
Reverso		5'-CGAAACTGGCACCCCTTGAAA-3'	
<b>18S</b>	<b>NR_046237</b>		
Directo		5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3'	70
Reverso		5'-GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3'	

CCL2: *chemokine (C-C) ligand-2*, TLR4: *Toll-like receptor 4*, PPAR $\gamma$ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, 18S: Subunidad ribosómica 18S.

### ➤ Método

Para sintetizar el ADN complementario (ADNc) del ARN, se utilizó el kit comercial iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, mezclando 1  $\mu$ g de ARN total, 4  $\mu$ l de tampón de reacción y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 20  $\mu$ l. La reacción se realizó en un termociclador (Creacon 0005.400) según las siguientes condiciones: 5 min a 25°C, 30 min a 42°C y 5 min a 85°C. El ADNc sintetizado se almacenó a -80°C hasta su amplificación por qPCR.

Para la qPCR, se preparó una mezcla con SYBR® Green Supermix, los *primers* del gen a amplificar, y 1  $\mu$ g de ADNc. La mezcla se sometió a amplificación en el termociclador (StepOne™, Applied Biosystems) según las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95°C durante 90 s, y 40 ciclos sucesivos de: 95°C 15 s, 60°C 30 s y 72°C 20 s.

Para comprobar la presencia de un único producto de reacción del tamaño esperado, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio y se comparó con un patrón comercial conteniendo productos de tamaño conocido. La visualización de las bandas se realizó con la ayuda del programa QuantityOne (Bio-Rad).

La cuantificación relativa se realizó mediante el método de comparación de Ct (threshold cycle), que es el ciclo en el cual la fluorescencia emitida por el SYBR

Green se detecta en la fase lineal. Se utiliza un control interno o *housekeeping* (18S) como elemento normalizador, de forma que la diferencia entre el Ct del gen diana y el Ct del *housekeeping* nos dará un valor de Ct ( $\Delta Ct$ ) del gen diana. Este valor sirve para normalizar la cantidad de ARN añadida a la reacción y corregir pequeñas variaciones. La relación obtenida al final de una reacción es de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que es igual a  $2^{-[(Ct_{muestra} - Ct_{18S}) - (Ct_{control} - Ct_{18S})]}$  para cada gen diana. Definimos "control" como aquella muestra sobre la que se comparó la expresión y sobre la que se relativizaron los resultados dándole el valor de 1. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de expresión (en veces de variación) entre la muestra problema y control.

## 8. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EICOSANOIDES

Para valorar la producción de los metabolitos derivados del ácido araquidónico, PGE2 y TXB2, se utilizaron kits comerciales (Arbor assays, Ann Arbor, Michigan, USA y Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA, respectivamente) basados en el método de enzimoimmunoensayo siguiendo los protocolos de los fabricantes.

La determinación se realizó en sobrenadantes de cultivos de acinos pancreáticos obtenidos de ratas control y en plasma de ratas control, ratas con PA-OBP 12 h y sham, no tratadas y tratadas con TAK-242 o con 15d-PGJ2.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa estadístico *IBM SPSS Statistics* para realizar los análisis estadísticos. Todos los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

Con el fin de valorar los cambios ocurridos en estudios *in vivo*, se realizaron estudios estadísticos individuales para cada uno de los grupos experimentales. Se aplicó en cada periodo experimental de pancreatitis una *t*-Student con el objetivo de establecer diferencias significativas entre el grupo de ratas sin PA (sham) y cada uno de los grupos con PA. El test *t* de Student también se aplicó en el análisis de las clorhidrinas de las diferentes áreas del tejido adiposo de ratas con PA-NaTc, así como en el análisis de las rutas de señalización en respuesta a ácido araquidónico.

También se utilizó el test de Análisis de la Varianza (ANOVA) para contrastar la igualdad de medias a los resultados obtenidos en los diferentes grupos, seguido del test de Tukey, que nos permitió establecer diferencias significativas entre los grupos sham y los grupos con PA, no tratados y tratados con TAK-242 o 15d-PGJ2.

En los estudios *in vitro*, se aplicó también el test de ANOVA seguido del test de Tukey, con el fin de establecer diferencias significativas respecto al grupo control y entre los diferentes grupos experimentales. En aquellos casos en los que se compararon dos variables (efecto de la concentración y el tipo de AG) se aplicó el test ANOVA de dos vías. Se consideraron diferencias significativas valores de  $p < 0,05$ .

## IV. RESULTADOS



## 1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE PA INDUCIDA POR TAUROCOLATO SÓDICO

Este modelo experimental de PA fue el elegido en nuestro estudio para recoger las muestras de tejido adiposo utilizadas para estudiar la respuesta acinar a lípidos.

### 1.1. Parámetros de diagnóstico

La Tabla 8 recoge los indicadores más representativos de la gravedad de la PA inducida por perfusión retrógrada en el conducto biliopancreático de taurocolato sódico (NaTc) (5%) y evaluada después de 6 h. Se observaron aumentos significativos ( $p < 0,01$ ) en la actividad amilasa y lipasa en plasma y ascitis, que refleja alteraciones de la función exocrina del páncreas. También se observó aumento significativo ( $p < 0,01$ ) en el hematocrito, acompañado de un elevado volumen de fluido ascítico y contenido acuoso en el intersticio de la glándula. Estas alteraciones indican extravasación plasmática como consecuencia de un aumento de la permeabilidad de la pared vascular. Como indicadores de la respuesta inflamatoria, se observaron incrementos significativos ( $p < 0,01$ ) tanto en la actividad mieloperoxidasa (MPO) en páncreas así como en la concentración plasmática de IL-1 $\beta$ .

**Tabla 8. Parámetros de diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) inducida por taurocolato sódico**

	Amilasa plasma (U/dl)	Amilasa ascitis (U/dl)	Lipasa plasma (U/dl)	Lipasa ascitis (U/dl)
<b>SHAM</b>	5,16 $\pm$ 0,28	3,81 $\pm$ 0,57	58,50 $\pm$ 10,48	15,53 $\pm$ 2,65
<b>PA</b>	11,68 $\pm$ 0,57**	67,52 $\pm$ 2,85**	1.172,40 $\pm$ 138,29**	7.508,80 $\pm$ 956,13**

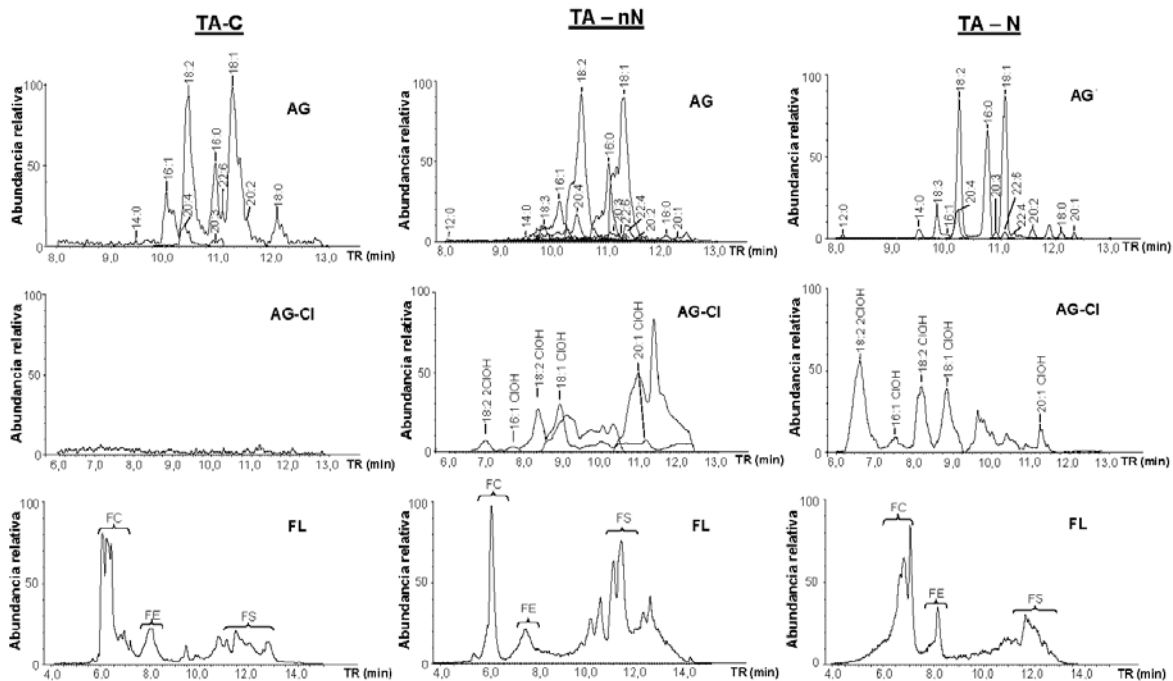
	Hematocrito (%)	Volumen ascitis (ml)	% Fluido páncreas	MPO páncreas (U/mg prot)	IL-1 $\beta$ plasma (pg/ml)
<b>SHAM</b>	43,72 $\pm$ 0,38	0,60 $\pm$ 0,12	73,11 $\pm$ 0,89	0,98 $\pm$ 0,096	49,38 $\pm$ 3,87
<b>PA</b>	57,90 $\pm$ 0,51**	7,5 $\pm$ 0,39**	79,73 $\pm$ 0,85**	14,13 $\pm$ 0,32**	348,98 $\pm$ 32,4**

Los valores representan medias  $\pm$  SEM. N=5 en cada grupo. Se aplicó el test *t*-Student para identificar diferencias significativas respecto al grupo SHAM (\*\*  $p < 0,01$ ).

## 1.2. Tejido adiposo

### 1.2.1. Análisis de la composición

La Figura 11 muestra los cromatogramas representativos del análisis por HPLC-MS del extracto lipídico del tejido adiposo de ratas control (TA-C) y de las zonas de la grasa no necróticas (TA-nN) y necróticas (TA-N) de ratas con PA. Se muestran las fracciones de ácidos grasos (AG), clorhidrinas de ácidos grasos (AG-CI) y fosfolípidos (FL). El perfil cromatográfico reveló un cambio en la composición de AG y AG-CI, así como en las proporciones de los diferentes tipos estructurales de FLs: fosfatidilcolinas (FC), fosfatidiletanolaminas (FE) y fosfatidilserinas (FS).

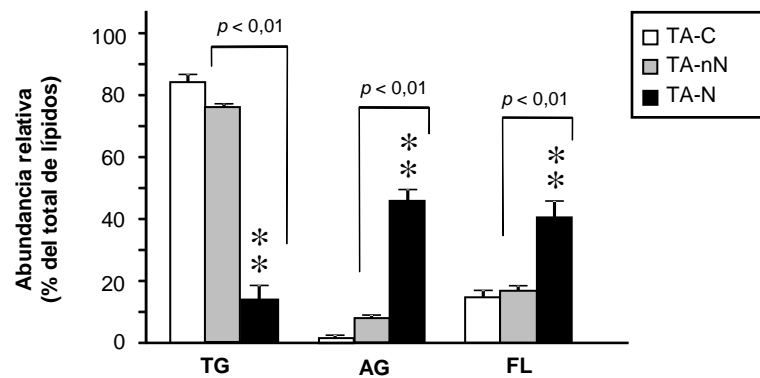


**Figura 11. Identificación por espectrometría de masas de ácidos grasos (AG), clorhidrinas de ácidos grasos (AG-CI) y fosfolípidos (FL) de tejido adiposo peripancreático de ratas control (TA-C) y de las áreas no necróticas (TA-nN) y necróticas (TA-N) de tejido adiposo de ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico al 5% (6 h).** Se muestran cromatogramas representativos que reflejan el tiempo de retención (TR) de cada compuesto y la abundancia relativa (área de cada pico) de AG, clorhidrinas de ácidos grasos (AG-CI) y fosfolípidos (FL), éstos últimos agrupados de acuerdo con su estructura química (FC: fosfatidilcolina, FE: fosfatidiletanolamina, FS: fosfatidilserina).

El análisis de la composición lipídica (Figura 12) mostró diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre los tejidos adiposos de ratas control y de ratas con PA. Únicamente en las regiones de focos necróticos se observó un descenso significativo ( $p < 0,01$ ) en la abundancia relativa de TGs, junto con un aumento en el contenido de AG y FL. Por el contrario, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas



entre el tejido adiposo control y el correspondiente a las áreas no necróticas de ratas con PA. Es de destacar, dentro del tejido adiposo de ratas a las que se les indujo PA, la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) observada en la composición relativa de TG, AG y FL entre las zonas correspondientes a los focos necróticos y el resto de tejido graso no necrótico.



**Figura 12. Composición lipídica de tejido adiposo peripancreático de ratas control (TA-C) y de las áreas no necróticas (TA-nN) y necróticas (TA-N) de tejido adiposo de ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico al 5% (6 h).** Los resultados se expresan como % (medias  $\pm$  SEM) de la composición total (TG: triglicéridos, AG: ácidos grasos, FL: fosfolípidos). N = 4. El test ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto al tejido adiposo control (\*\*  $p < 0,01$ ) y entre las áreas no necróticas y necróticas ( $p < 0,01$ ).

La Tabla 9 recoge los valores porcentuales de cada AG en cada uno de los tres tipos de tejido graso. En las áreas necróticas del tejido adiposo de ratas con PA resultaron mayoritarios el ácido palmítico y el ácido esteárico, como ácidos grasos saturados, y el ácido oleico, el ácido linoleico y el ácido araquidónico, como ácidos grasos insaturados. En comparación con el tejido adiposo de ratas control, se detectó en los focos necróticos de tejido graso de ratas con PA un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) en el porcentaje de ácido palmítico, así como un descenso ( $p < 0,01$ ) de los ácidos grasos mono-insaturados palmitoleico y oleico. Además, se detectaron otros ácidos grasos que no aparecieron en grasa control. Asimismo, resulta destacable el mayor porcentaje ( $p < 0,05$ ) de ácido araquidónico en el tejido necrótico respecto al no necrótico.

El tejido adiposo de ratas con PA, tanto no necrótico como necrótico, mostró una significativa mayor proporción de ácidos grasos saturados respecto a insaturados. El análisis relativo de la proporción de ácidos grasos poliinsaturados vs ácidos grasos mono-insaturados reveló un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) respecto al control únicamente en el tejido necrótico.

**Tabla 9. Porcentaje de ácidos grasos (AG) en tejido adiposo peripancreático de ratas control y ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por taurocolato sódico (5%)**

AG		Control	PA	
			No necrótico	Necrótico
		%	%	%
Ác. Láurico	(12:0)	-	0,29 ± 0,01 **	0,06 ± 0,02 *♦♦
Ác. Mirístico	(14:0)	0,57 ± 0,05	0,29 ± 0,01	0,47 ± 0,09
Ác. Palmítico	(16:0)	13,36 ± 0,13	16,15 ± 0,35	18,75 ± 0,91 **
Ác. Palmitoleico	(16:1)	9,38 ± 0,32	10,64 ± 0,23	3,37 ± 0,36 **♦♦
Ác. Esteárico	(18:0)	2,95 ± 0,99	4,45 ± 0,28	4,68 ± 1,24
Ác. Oleico	(18:1)	37,38 ± 2,23	27,74 ± 0,78 *	29,54 ± 1,70 *
Ác. Linoleico	(18:2)	28,04 ± 1,44	33,16 ± 0,57	30,33 ± 1,89
Ác. Linolénico	(18:3)	-	2,08 ± 0,17 **	2,78 ± 0,37 **
Ác. Gadoleico	(20:1)	-	0,86 ± 0,06 **	0,93 ± 0,20 **
Ác. Eicosadienoico	(20:2)	1,23 ± 0,36	0,16 ± 0,04	0,8 ± 0,24
Ác. Dihomo-gamma-linolénico	(20:3)	0,77 ± 0,13	0,44 ± 0,06	1,27 ± 0,06 **♦♦
Ác. Araquidónico	(20:4)	4,67 ± 0,14	2,70 ± 0,31 *	4,65 ± 0,54 ♦
Ác. Adrénico	(22:4)	-	0,48 ± 0,12 **	0,75 ± 0,05 **
Ác. Docosaheptaenoico	(22:6)	1,64 ± 0,13	1,80 ± 0,38	1,62 ± 0,04
Saturados/Insaturados		0,20 ± 0,02	0,28 ± 0,01 *	0,32 ± 0,02 **
Poli-insaturados/Mono-insaturados		0,78 ± 0,08	1,03 ± 0,40	1,25 ± 0,13 *

Los valores representan medias ± SEM. N=4. El test ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias respecto al tejido adiposo control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y entre las áreas no necróticas y necróticas (♦  $p < 0,05$ , ♦♦  $p < 0,01$ ).

Las clorhidrinas de ácidos grasos fueron indetectables en el tejido adiposo control, pero se hallaron en los tejidos grasos de ratas con PA (Figura 11). Como se muestra en la Tabla 10, la mayor cantidad de clorhidrinas encontradas tanto en tejido graso no necrótico como necrótico, fueron las derivadas del ácido linoleico, siendo la monoclorhidrina la más abundante en áreas no necróticas y la bisclorhidrina en los focos necróticos. Además, la cantidad de clorhidrinas totales detectadas en los focos necróticos fue casi 1,5 veces más alta que en aquellas áreas del tejido adiposo que no sufrieron necrosis.

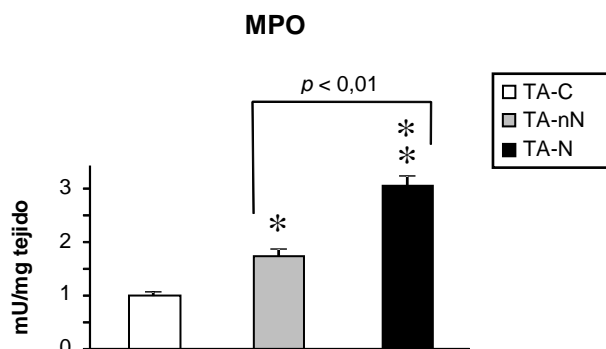
**Tabla 10. Concentración de clorhidrinas de ácidos grasos (AG-Cl) en tejido adiposo peripancreático de ratas control y ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por taurocolato sódico (5%)**

AG-Cl	Control	PA	
		No necrótico (nmol/mg AG)	Necrótico (nmol/mg AG)
16:1 1ClOH	-	0,20 ± 0,06	0,09 ± 0,07
18:1 1ClOH	-	0,22 ± 0,02	0,34 ± 0,09
18:2 1ClOH	-	0,41 ± 0,05	0,23 ± 0,07
18:2 2ClOH	-	0,12 ± 0,01	0,65 ± 0,20 <sup>♦</sup>
20:1 1ClOH	-	0,07 ± 0,01	0,17 ± 0,06
Totales	-	1,02 ± 0,06	1,48 ± 0,11 <sup>♦</sup>

Los valores representan medias ± SEM. N=4. El test *t*-Student reveló diferencias significativas entre las áreas no necróticas y necróticas (<sup>♦</sup>  $p < 0,05$ ).

### 1.2.2. Infiltración de neutrófilos

La Figura 13 muestra los resultados de la actividad de la enzima MPO en el tejido graso peripancreático como índice de la infiltración de neutrófilos. Los resultados indicaron una significativa ( $p < 0,05$ ) acumulación de células inflamatorias en el tejido adiposo de ratas con PA en comparación con el tejido control. La infiltración leucocitaria fue significativamente mayor ( $p < 0,01$ ) en los focos necróticos que en las áreas no necróticas, alcanzando valores hasta tres veces más altos que los del tejido control.



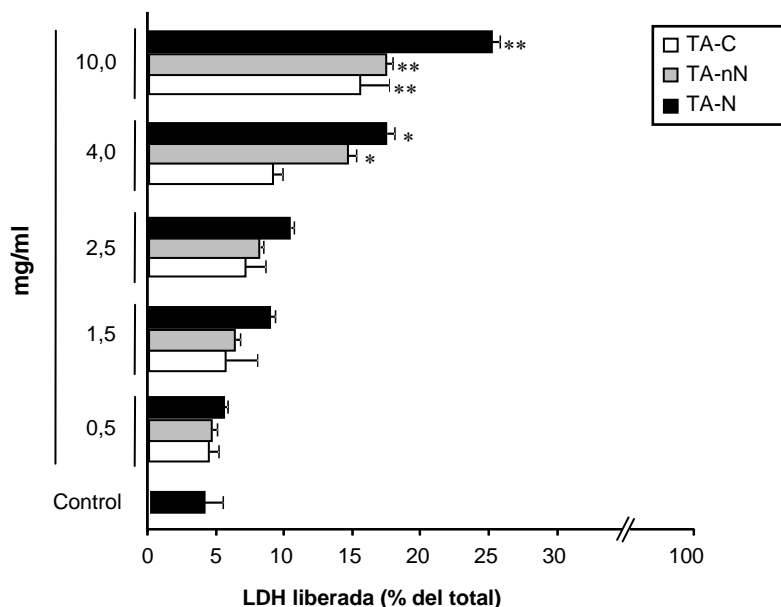
**Figura 13. Actividad mieloperoxidasa (MPO) en tejido adiposo peripancreático de ratas control (TA-C) y de las áreas no necróticas (TA-nN) y necróticas (TA-N) de tejido adiposo de ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico al 5% (6 h).** Los resultados se expresan como mU de actividad MPO/mg tejido. Los valores representan medias ± SEM de cinco experimentos. El test ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto al tejido adiposo control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y entre las áreas no necróticas y necróticas ( $p < 0,01$ ).

## 2. EFECTOS DEL EXTRACTO LIPÍDICO DE TEJIDO ADIPOSO EN ACINOS PANCREÁTICOS

### 2.1. Daño celular

Se observaron cambios dosis-dependientes en la LDH liberada de acinos pancreáticos incubados en presencia de diferentes concentraciones del extracto lipídico obtenido tanto de focos necróticos como de áreas no necróticas de tejido adiposo de ratas con PA (Figura 14). Extracto lipídico de tejido adiposo peripancreático de ratas control o con PA, añadido a concentraciones  $\leq 2,5$  mg/ml no indujo daño celular significativo comparado con acinos incubados en ausencia de lípidos (control), en tanto que concentraciones más elevadas de lípidos, procedentes tanto de tejido no necrótico como de necrótico de ratas con PA, indujeron un aumento significativo de daño celular. También, el extracto lipídico de ratas control a la concentración de 10 mg/ml, redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) la viabilidad acinar.

En base a estos resultados, se eligió la concentración de 2,5 mg/ml para llevar a cabo el estudio de la respuesta inflamatoria acinar a extracto lipídico de tejido adiposo.

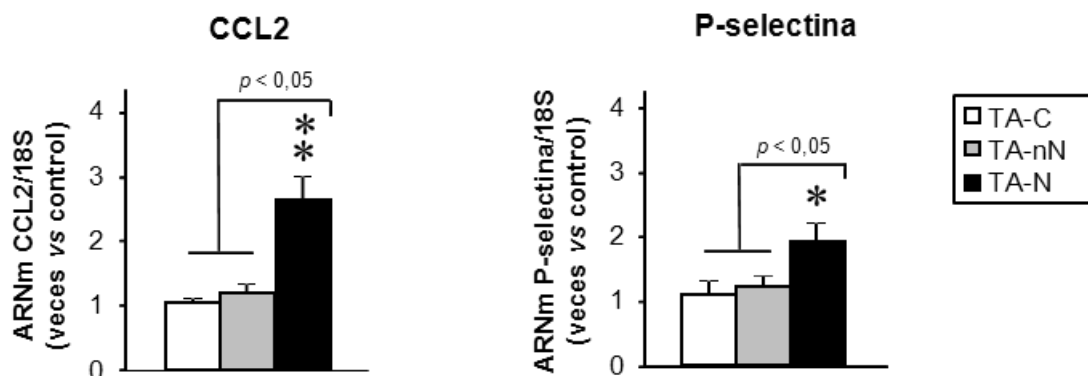


**Figura 14.** Lactato deshidrogenasa (LDH) liberada desde los acinos al medio en respuesta al extracto lipídico de tejido adiposo peripancreático de ratas control (TA-C) y de las áreas no necróticas (TA-nN) y necróticas (TA-N) de tejido adiposo de ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico al 5% (6 h). Los resultados se expresan como % de la actividad LDH total (medida dentro y fuera de las células). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El test ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos incubados en ausencia de lípidos (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

## 2.2. Respuesta inflamatoria

### 2.2.1. Expresión de genes

En comparación con acinos incubados en ausencia de lípidos (controles), se observó un incremento significativo en la expresión de ARNm de los mediadores inflamatorios CCL2 ( $p < 0,01$ ) y P-selectina ( $p < 0,05$ ) en acinos pancreáticos incubados en presencia de 2,5 mg/ml del extracto lipídico procedente de focos necróticos (Figura 15). Por el contrario, ningún efecto se observó en la expresión génica de acinos incubados en presencia de tejido adiposo de ratas control o con el correspondiente a zonas no necróticas de ratas con PA. El análisis estadístico reveló diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión de estos genes en respuesta al extracto lipídico de los focos necróticos en comparación con las regiones no necróticas del mismo tejido adiposo.

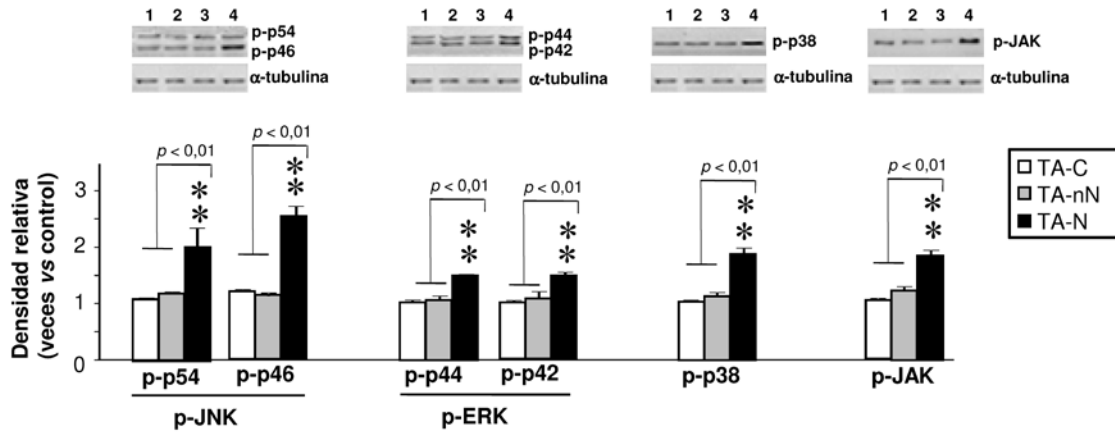


**Figura 15.** Expresión de ARNm de CCL2 y P-selectina en respuesta al extracto lipídico (2,5 mg/ml) de tejido adiposo peripancreático de ratas control (TA-C) y de las áreas no necróticas (TA-nN) y necróticas (TA-N) de tejido adiposo de ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico al 5% (6 h). Los resultados se muestran como el ratio ARNm de CCL2 o de P-selectina/ARNm de 18S y se expresan como veces de aumento vs acinos incubados en ausencia de extracto lipídico (controles). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El test ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos expuestos a extracto lipídico de áreas necróticas ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.2. Rutas de señalización

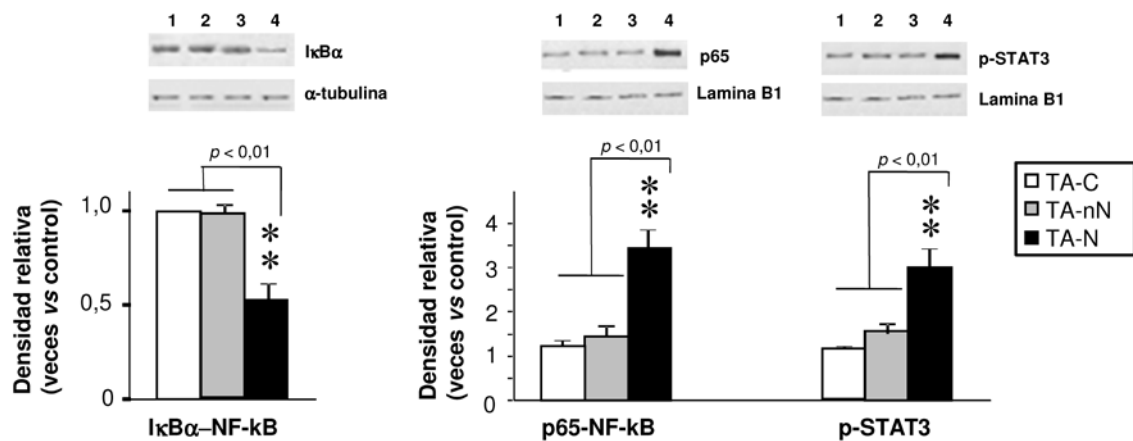
La Figura 16 muestra los resultados de activación de cinasas. La exposición de acinos pancreáticos al extracto lipídico de tejido adiposo peripancreático de ratas control o de las zonas no necróticas de tejido graso de ratas con PA no ejerció ningún efecto sobre la activación de ninguna de las cinasas analizadas. Por el contrario, lípidos de focos necróticos indujeron fosforilación de las tres MAPKs (JNK, ERK y

p38) y JAK alcanzando valores significativamente más altos ( $p < 0,01$ ) que en acinos incubados en presencia de lípidos de tejido control o no necrótico.



**Figura 16. Formas fosforiladas de MAPKs (p-JNK, p-ERK, p-p38) y p-JAK en respuesta al extracto lipídico de tejido adiposo peripancreático de ratas control (TA-C) y de las áreas no necróticas (TA-nN) y necróticas (TA-N) de tejido adiposo de ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida con taurocolato sódico al 5% (6 h).** Se muestran geles representativos de cinco experimentos (1: acinos incubados en ausencia de lípidos (controles), 2: acinos incubados con lípidos de ratas control, 3: acinos incubados con lípidos de áreas no necróticas de ratas con PA, 4: acinos incubados con lípidos de áreas necróticas de ratas con PA). El análisis densitométrico de la intensidad de las bandas se expresa como veces de aumento vs acinos control, considerando la concentración de cada cinasa normalizada con la de  $\alpha$ -tubulina (control de carga proteica). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El test ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con extracto lipídico de áreas necróticas ( $p < 0,01$ ).

Los resultados del análisis de la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3 se recogen en la Figura 17, donde se observa que únicamente el extracto lipídico de los focos necróticos incrementó significativamente ( $p < 0,01$ ) la activación de NF- $\kappa$ B, valorada por dos métodos complementarios: degradación citoplasmática de I $\kappa$ B $\alpha$  y aumento en la translocación nuclear de p65. De la misma forma, STAT3 en su forma fosforilada y, por lo tanto, activa, solo aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) en los extractos nucleares de acinos incubados con lípidos de las áreas necróticas. Ninguno de los dos factores de transcripción se activó en respuesta a los extractos lipídicos de tejido adiposo de ratas control o de las áreas no necróticas de ratas con PA.



**Figura 17. Activación de los factores de transcripción NF-κB (IκBα y p65) y STAT3 en respuesta al extracto lipídico de tejido adiposo peripancreático de ratas control (TA-C) y de las áreas no necróticas (TA-nN) y necróticas (TA-N) de tejido adiposo de ratas con pancreatitis aguda inducida con taurocolato sódico al 5% (6 h).** Se muestran geles representativos de cinco experimentos (1: acinos incubados en ausencia de lípidos (controles), 2: acinos incubados con lípidos de ratas control, 3: acinos incubados con lípidos de áreas no necróticas de ratas con PA, 4: acinos incubados con lípidos de áreas necróticas de ratas con PA). El análisis densitométrico de la intensidad de las bandas se expresa como veces de aumento vs acinos control, considerando la concentración de cada proteína normalizada con la de α-tubulina o lamina B1 (control de carga proteica citoplasmática y nuclear, respectivamente). Los valores representan medias ± SEM. El test ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos tratados con extracto lipídico de áreas necróticas ( $p < 0,01$ ).

Una vez descrito el papel del extracto total de lípidos sobre la respuesta inflamatoria de acinos pancreáticos, pasamos a evaluar la contribución de las dos fracciones principales: ácidos grasos y fosfolípidos.

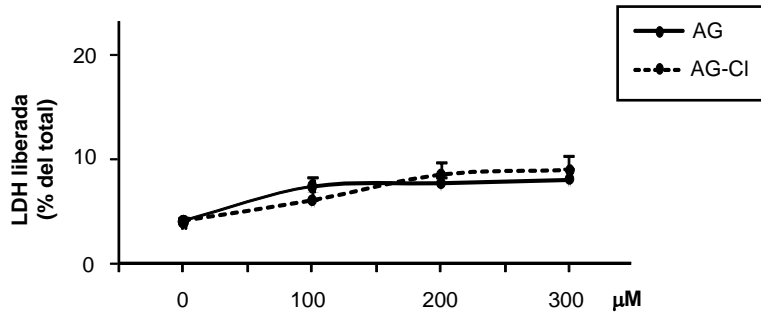
### 3. EFECTOS DE LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y SUS CLORHIDRINAS EN ACINOS PANCREÁTICOS

A continuación mostramos los efectos observados en acinos pancreáticos de rata control en respuesta a la fracción de ácidos grasos totales obtenidos de tejido adiposo peripancreático de ratas control y al conjunto de clorhidrinas obtenidas químicamente.

#### 3.1. Daño celular

En comparación con acinos incubados en ausencia de estos compuestos lipídicos, no se observaron diferencias en la liberación de LDH tras la exposición de

acinos pancreáticos al total de ácidos grasos ni al conjunto de clorhidrinas, cuando se añadieron en concentraciones entre 100 y 300  $\mu\text{M}$  (Figura 18).

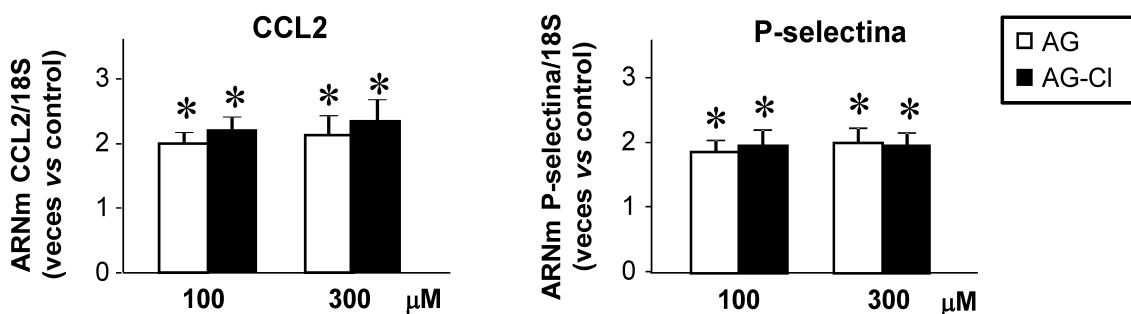


**Figura 18.** Lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio en respuesta a la fracción de ácidos grasos (AG) de tejido adiposo de ratas control o al conjunto de clorhidrinas de ácidos grasos (AG-Cl). Los resultados se expresan como % de la actividad LDH total (medida dentro y fuera de las células). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El test estadístico ANOVA no reveló diferencias significativas entre los diferentes grupos.

### 3.2. Respuesta inflamatoria en acinos pancreáticos de ratas control

Tanto la fracción de ácidos grasos como el conjunto de clorhidrinas indujeron aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) en la expresión de los genes inflamatorios CCL2 y P-selectina (Figura 19), con valores similares en respuesta a las concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$ , no observándose, por tanto, un efecto dosis-respuesta.

El test estadístico no reveló diferencias significativas entre la respuesta acinar obtenida con ácidos grasos o clorhidrinas de ácidos grasos a ninguna de las concentraciones ensayadas.



**Figura 19.** Expresión de ARNm de CCL2 y de P-selectina en acinos pancreáticos de ratas control en respuesta a la fracción de ácidos grasos (AG) (100  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$ ) de tejido adiposo de ratas control o al conjunto de clorhidrinas de ácidos grasos (AG-Cl) (100  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$ ). Los resultados muestran el ratio ARNm de CCL2 o de P-selectina/18S y se expresan como veces de aumento vs acinos incubados en ausencia de lípidos (control). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey solo reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*  $p < 0,05$ ).



### 3.3. Respuesta inflamatoria en acinos pancreáticos de ratas con pancreatitis aguda inducida por obstrucción biliopancreática (PA-OBP)

La Figura 20 muestra la expresión de CCL2 en acinos control y acinos aislados de ratas al cabo de 3 h de inducir PA por OBP. La sobreexpresión acinar de CCL2 observada en ratas con PA-OBP incrementó significativamente ( $p < 0,01$ ) en presencia de la fracción total de ácidos grasos o al conjunto de clorhidrinas de ácidos grasos. Tal como se observó en acinos de ratas control, la respuesta a ácidos grasos y a clorhidrinas de ácidos grasos resultó similar también en acinos de ratas con PA-OBP.

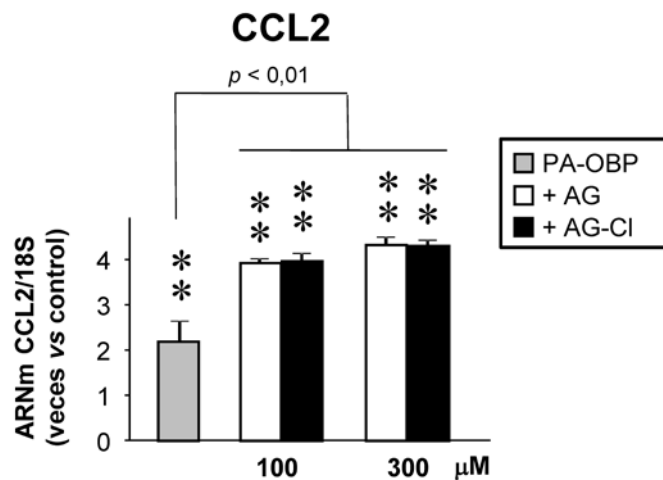


Figura 20. Expresión de ARNm de CCL2 en acinos pancreáticos de ratas con pancreatitis aguda inducida por obstrucción bilio-pancreática (PA-OBP, 3 h) en respuesta a la fracción de ácidos grasos (AG) (100  $\mu$ M y 300  $\mu$ M) de tejido adiposo de ratas control o al conjunto de clorhidrinas de ácidos grasos (AG-CI). Los resultados muestran el ratio ARNm de CCL2/18S y se expresan como veces de aumento vs acinos de ratas control. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El test ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos de ratas control (\*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos de ratas con PA-OBP incubados en ausencia de lípidos ( $p < 0,01$ ).

## 4. EFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS INDIVIDUALES Y DE LAS CLORHIDRINAS EN ACINOS PANCREÁTICOS

Para estudiar la contribución relativa de los principales ácidos grasos a la respuesta inflamatoria observada a la fracción total de ácidos grasos, se analizó, de forma individual, la respuesta de acinos pancreáticos de ratas control a los ácidos grasos mayoritarios saturados (palmítico, esteárico) e insaturados (oleico, linoleico) presentes en extractos lipídicos de tejido adiposo peripancreático o a las clorhidrinas de oleico y linoleico.

Asimismo, se han estudiado los efectos individuales de las clorhidrinas de los ácidos grasos insaturados mayoritarios (oleico y linoleico) a fin de poder confirmar que el efecto de la cloración no modifica la respuesta inflamatoria.

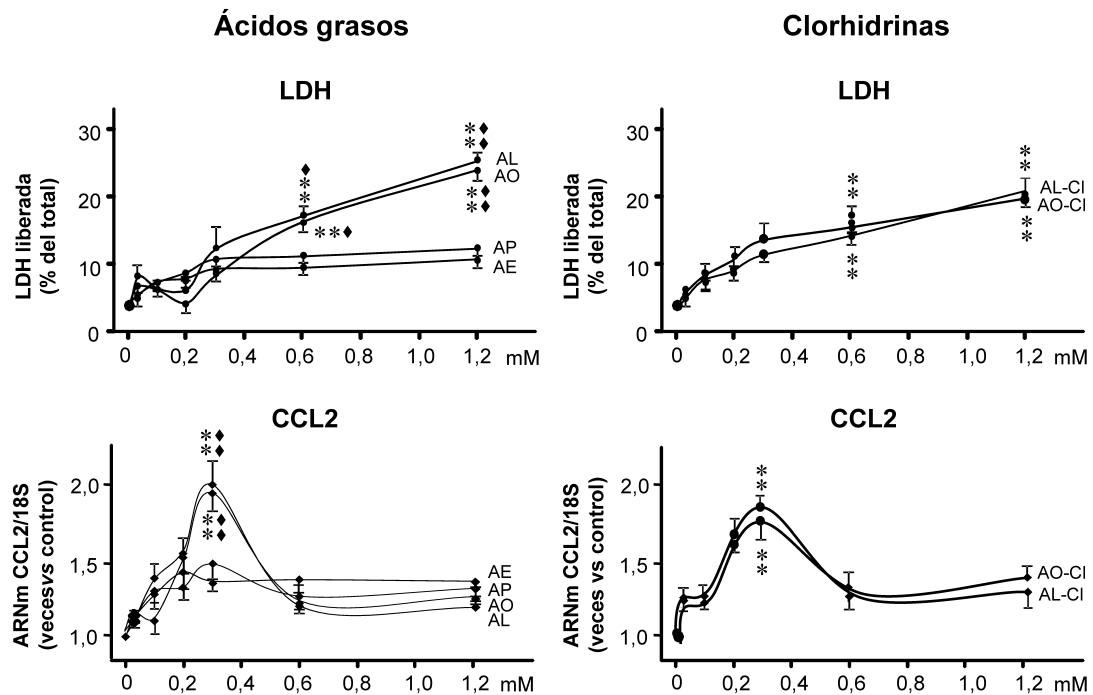
#### **4.1. Respuesta a los ácidos grasos mayoritarios**

##### **4.1.1. Estudio dosis-respuesta**

La Figura 21 muestra resultados de viabilidad celular (actividad LDH extracelular) y de expresión génica de CCL2 en respuesta a concentraciones crecientes de cada uno de los ácidos grasos o a las clorhidrinas de los correspondientes ácidos grasos insaturados. Los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico no indujeron daños celulares significativos a concentraciones  $\leq 1200 \mu\text{M}$ . En respuesta a los ácidos grasos insaturados, oleico y linoleico, se observó daño acinar, que resultó significativo ( $p < 0,01$ ) a concentraciones  $\geq 600 \mu\text{M}$  y que aumentó progresivamente a concentraciones mayores, alcanzando valores próximos al 25% cuando ácido oleico o ácido linoleico se añadieron al medio de incubación a la concentración de  $1200 \mu\text{M}$ . No se observaron diferencias significativas entre los efectos ejercidos por los ácidos oleico y linoleico. Sin embargo, diferencias entre cada uno de estos ácidos grasos insaturados y los saturados ácido palmítico y ácido esteárico resultaron significativas a las concentraciones de  $600 \mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) y  $1200 \mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ).

Las clorhidrinas de los ácidos oleico y linoleico, al igual que sus respectivos ácidos grasos no modificados, indujeron daño acinar significativo ( $p < 0,01$ ) a partir de  $600 \mu\text{M}$ .

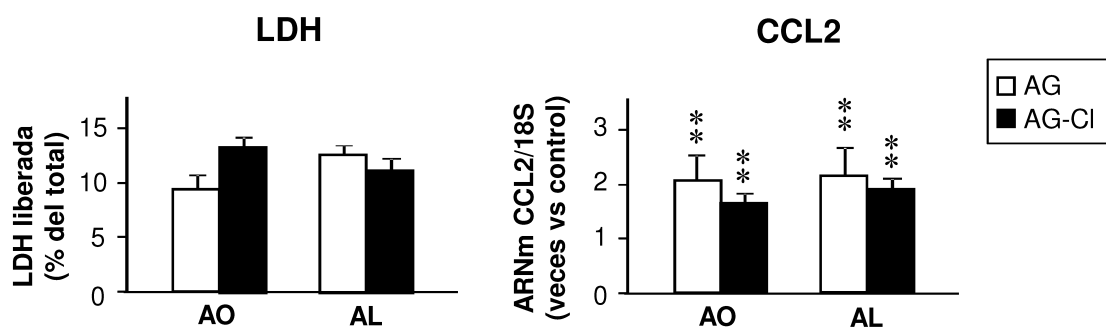
La expresión de CCL2 en acinos pancreáticos no varió significativamente en respuesta a los ácidos grasos saturados palmítico o esteárico a concentraciones  $\leq 1200 \mu\text{M}$ . Por el contrario, en respuesta a los ácidos grasos insaturados oleico o linoleico, así como sus clorhidrinas, indujeron un aumento dosis-dependiente de la expresión acinar de CCL2 a concentraciones  $> 300 \mu\text{M}$ , aunque significación estadística ( $p < 0,01$ ) solo se alcanzó cuando  $300 \mu\text{M}$  de ácido oleico, ácido linoleico o sus respectivas clorhidrinas se añadieron al medio de incubación. La expresión de CCL2 se redujo a valores controles en acinos expuestos a aquellas concentraciones que resultaron significativamente ( $p < 0,01$ ) citotóxicas ( $600$  y  $1200 \mu\text{M}$ ).



**Figura 21.** Respuesta acinar a ácido palmítico (AP), ácido esteárico (AE), ácido oleico (AO), ácido linoleico (AL) o, en su caso, a clorhidrinas de ácido oleico (AO-CI) o clorhidrinas de ácido linoleico (AL-CI). Dosis-respuesta en relación con la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio y expresión de ARNm de CCL2. Los resultados de actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio se expresan como % de la actividad LDH total (medida dentro y fuera de las células). En los gráficos de expresión génica se consideró el ratio ARNm de CCL2/18S, y los resultados se expresan como veces de aumento vs acinos incubados en ausencia de lípidos (control). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico de ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas vs acinos control cuando se analizó el efecto de la concentración (\*\*  $p < 0,01$ ) y cuando a cada concentración se analizaron diferencias entre ácidos grasos insaturados (AO, AL) y ácidos grasos saturados (AE, AP) ( $\diamond p < 0,05$ ,  $\blacklozenge p < 0,01$ ).

En base a todos estos resultados, se eligió la concentración de 300  $\mu$ M en experimentos posteriores para estudiar sus mecanismos de acción sobre la respuesta inflamatoria en acinos pancreáticos.

La comparación de los efectos ejercidos a esta concentración por los ácidos grasos insaturados oleico y linoleico, y sus respectivas clorhidrinas, se muestran en la Figura 22. Ninguna diferencia significativa se observó como consecuencia de la cloración ni en la viabilidad celular ni en la expresión de CCL2 respecto a los resultados obtenidos con el ácido oleico y el ácido linoleico.

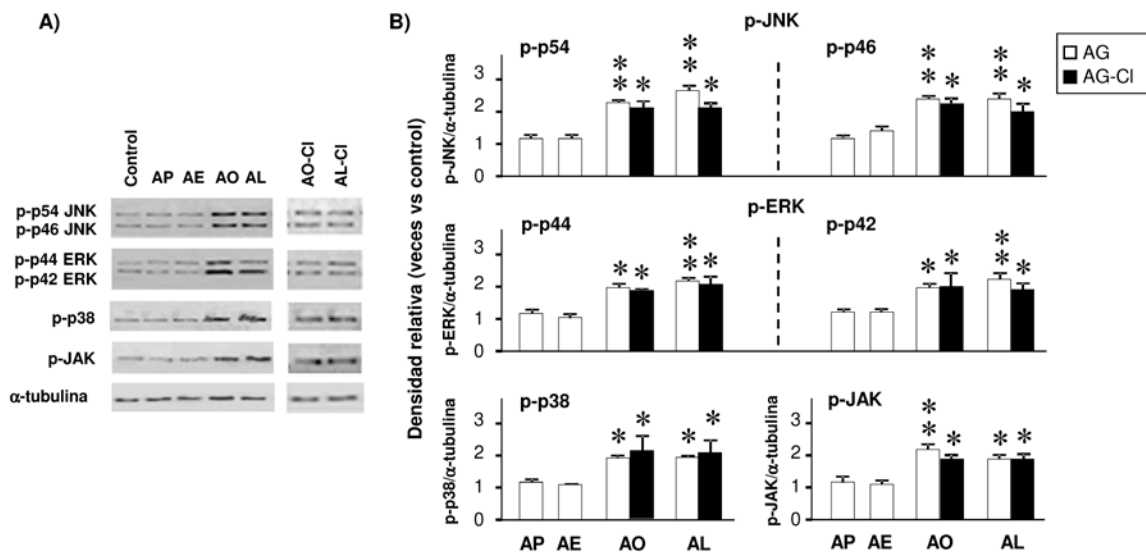


**Figura 22. Comparación de la viabilidad celular y de la expresión de CCL2 en respuesta a 300  $\mu$ M de ácido oleico (AO) y ácido linoleico (AL) o a clorhidrinas de ácido oleico (AO-Cl) o clorhidrinas de ácido linoleico (AL-Cl).** Los resultados de actividad LDH en el medio se expresan como % de la actividad LDH total (medida dentro y fuera de las células). En los gráficos de expresión génica se consideró el ratio ARNm de CCL2/18S, y los resultados se expresan como veces de aumento vs acinos incubados en ausencia de lípidos (control). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El test estadístico *t*-Student no reveló diferencias significativas entre AG y AG-Cl.

#### 4.1.2. Rutas de señalización de la respuesta inflamatoria

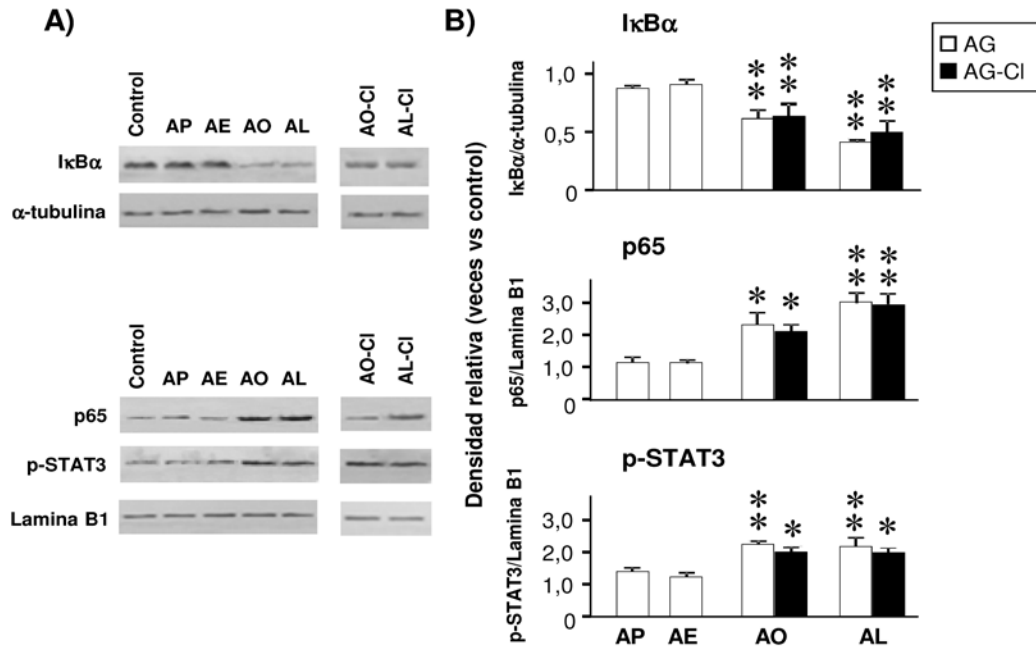
Los resultados de la activación de MAPKs (JNK, ERK y p38) y JAK se muestran en la Figura 23. Los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico no ejercieron ningún efecto en la activación de ninguna de estas rutas. Por el contrario, se detectaron aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) en la fosforilación tanto de MAPKs (p54-JNK, p46-JNK, p44-ERK, p42-ERK y p38) como de JAK en respuesta a ácido oleico, a ácido linoleico o a sus correspondientes clorhidrinas.

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los ácidos grasos insaturados no modificados y los modificados por cloración.



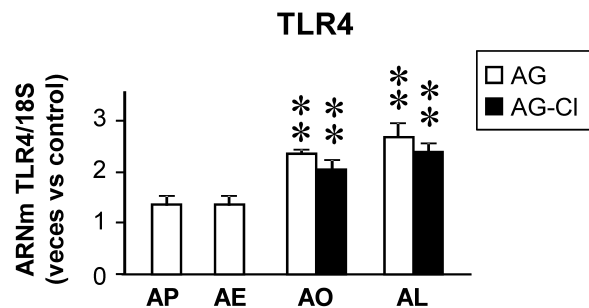
**Figura 23.** Formas fosforiladas de MAPKs (p-JNK, p-ERK y p-p38) y p-JAK en respuesta a 300  $\mu$ M a ácido palmítico (AP), ácido esteárico (AE), ácido oleico (AO), ácido linoleico (AL) o a clorhidrinas de ácido oleico (AO-Cl) o clorhidrinas de ácido linoleico (AL-Cl). Se muestran Western blots representativos (A) y análisis densitométrico de la intensidad relativa de las bandas (B) de cada p-MAPK o p-JAK respecto a  $\alpha$ -tubulina (control de carga). Los resultados se expresan como veces de aumento vs acinos incubados en ausencia de lípidos (control) (medias  $\pm$  SEM). N = 5. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

La Figura 24 muestra los resultados de la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (valorado por la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma y translocación de p65 al núcleo) y STAT3. Ninguno de los ácidos grasos saturados ensayados (palmítico y esteárico) produjo activación de estos factores de transcripción. Sin embargo, los ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico) y las clorhidrinas de los mismos redujeron significativamente los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  citoplasmático ( $p < 0,01$ ) a la vez que incrementaron p65 a nivel nuclear ( $p < 0,05$ ), lo cual reflejó una activación de NF- $\kappa$ B. Asimismo, se observó una activación de STAT3 (valorado por la concentración de p-STAT3 en el núcleo) en respuesta a los ácidos oleico y linoleico y sus correspondientes clorhidrinas. La comparación estadística entre los resultados obtenidos en respuesta a los ácidos grasos insaturados no clorados y a los clorados no reveló diferencias significativas.



**Figura 24.** Activación de los factores de transcripción NF-κB (IκBα y p65) y STAT3 (p-STAT3) en respuesta a ácido palmítico (AP), ácido esteárico (AE), ácido oleico (AO), ácido linoleico (AL), clorhidrinas de ácido oleico (AO-CI) o clorhidrinas de ácido linoleico (AL-CI). Se muestran Western blots representativos (A) y análisis densitométrico de la intensidad relativa de las bandas (B) de IκBα vs α-tubulina o p65 y STAT3 fosforilada (p-STAT3) vs lamina B1. Los resultados se expresan como veces de variación vs acinos incubados en ausencia de lípidos (control). Los valores representan medias ± SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló únicamente diferencias significativas respecto a acinos control (\* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

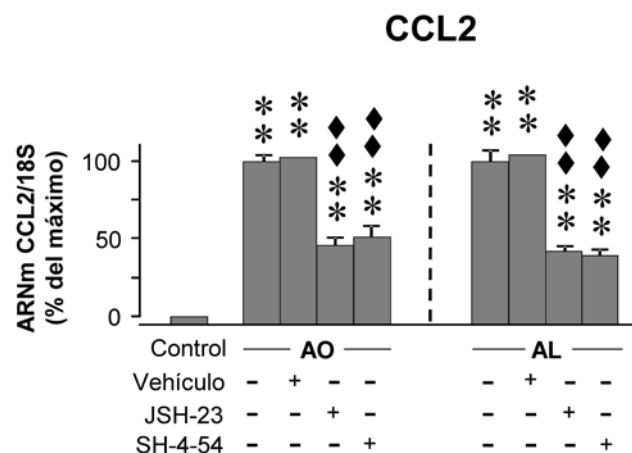
El análisis de la expresión génica de TLR4 se muestra en la Figura 25. Los resultados indicaron que, a la concentración de 300 μM, solo los ácidos grasos insaturados, oleico y linoleico, y sus correspondientes clorhidrinas, aumentaron significativamente ( $p < 0,01$ ) la expresión de ARNm de TLR4 en acinos pancreáticos. Por el contrario, ninguna variación significativa se observó en respuesta a los ácidos grasos saturados palmítico o esteárico.



**Figura 25.** Expresión de ARNm de TLR4 en respuesta a ácido palmítico (AP), ácido esteárico (AE), ácido oleico (AO), ácido linoleico (AL), clorhidrinas de ácido oleico (AO-CI) o clorhidrinas de ácido linoleico (AL-CI). Se consideró el ratio ARNm de TLR4/18S y los resultados se expresan como veces de aumento vs acinos incubados en ausencia de lípidos (control). Los valores representan medias ± SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico de ANOVA seguido del test de Tukey mostró diferencias significativas vs acinos control (\*\*  $p < 0,01$ ).

En resumen, todos los resultados obtenidos indicaron que únicamente los ácidos grasos insaturados indujeron respuesta inflamatoria en acinos pancreáticos, la cual no se vio modificada por la cloración de los mismos. Por ello, los experimentos llevados a cabo para valorar las rutas de señalización implicadas en la expresión acinar de genes inflamatorios se realizaron únicamente con el ácido oleico y el ácido linoleico sin modificar químicamente. Los resultados se muestran en las Figuras 26 y 27.

El pretratamiento de acinos pancreáticos con los inhibidores de NF- $\kappa$ B (JSH-23) o STAT3 (SH-4-54) redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) la expresión de ARNm de CCL2 inducida por los ácidos grasos oleico y linoleico. Sin embargo, ninguno de los dos inhibidores consiguió una represión total, sino que los valores de expresión del gen todavía resultaron significativamente ( $p < 0,01$ ) más altos que en acinos control (Figura 26).



**Figura 26. Efecto de los inhibidores de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (JSH-23, 30  $\mu$ M) y STAT3 (SH-4-54, 1  $\mu$ M) sobre la expresión de ARNm de CCL2 en respuesta a 300  $\mu$ M de ácido oleico (AO) o ácido linoleico (AL).** Los resultados (ARNm CCL2/18S) se expresan como porcentaje de la respuesta máxima. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. Se observaron diferencias significativas vs acinos control (\*\*  $p < 0,01$ ) y vs acinos tratados con OA o LA (◆◆  $p < 0,01$ ) cuando se aplicó el test estadístico ANOVA seguido del test de Tukey.

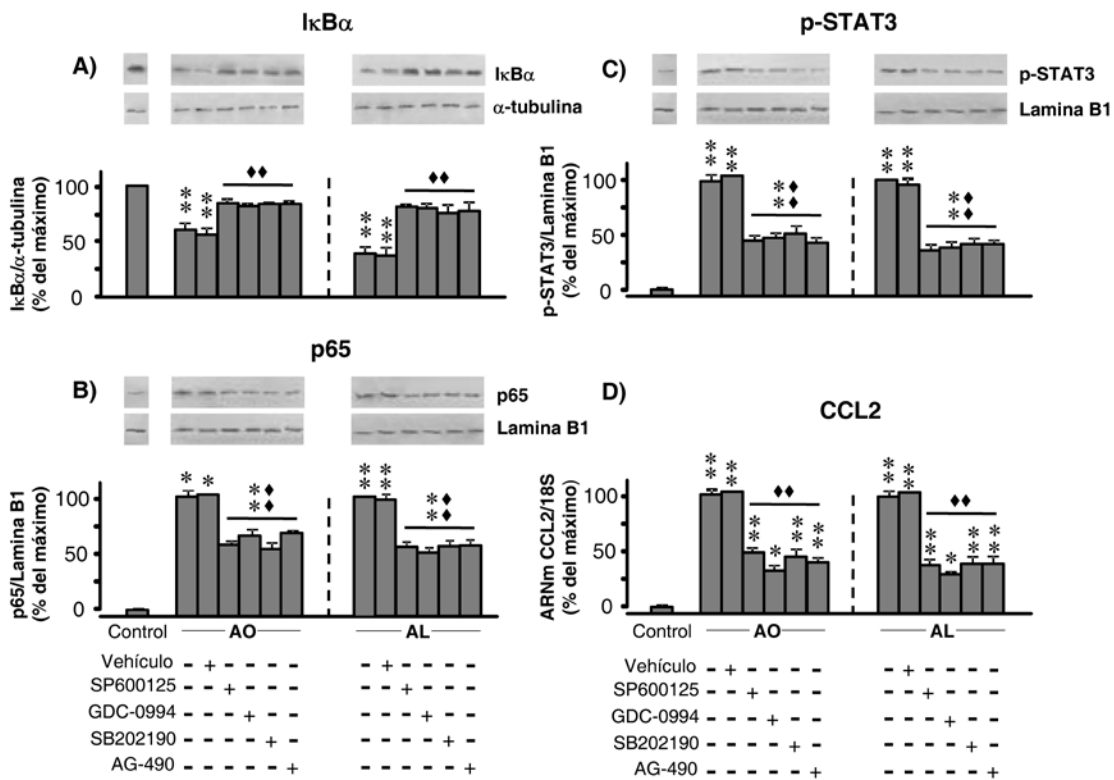
Inhibidores específicos de MAPKs y JAK se utilizaron para comprobar la implicación de estas rutas en la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3, así como en la expresión de ARNm de CCL2 inducida por el ácido oleico y el ácido linoleico. Los análisis densitométricos de I $\kappa$ B $\alpha$  (Figura 27A) y p65 (Figura 27B) revelaron que la presencia en el medio de incubación de SP600125, GDC-0994 o SB202190 (inhibidores de JNK, ERK y p38, respectivamente), así como de AG-490

(inhibidor de JAK), redujeron significativamente ( $p < 0,01$ ) tanto la degradación de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  como el aumento de la concentración de p65 a nivel nuclear inducido en respuesta a ácido oleico o ácido linoleico.

De forma similar, la fosforilación de STAT3 (Figura 27C) inducida por los ácidos grasos insaturados se redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) cuando los acinos se incubaron en presencia de SP600125, GDC-0994, SB202190 o AG-490.

El pretratamiento con los inhibidores de MAPKs o JAK también redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) el aumento de expresión de CCL2 inducido por ácido oleico o linoleico (Figura 27D).

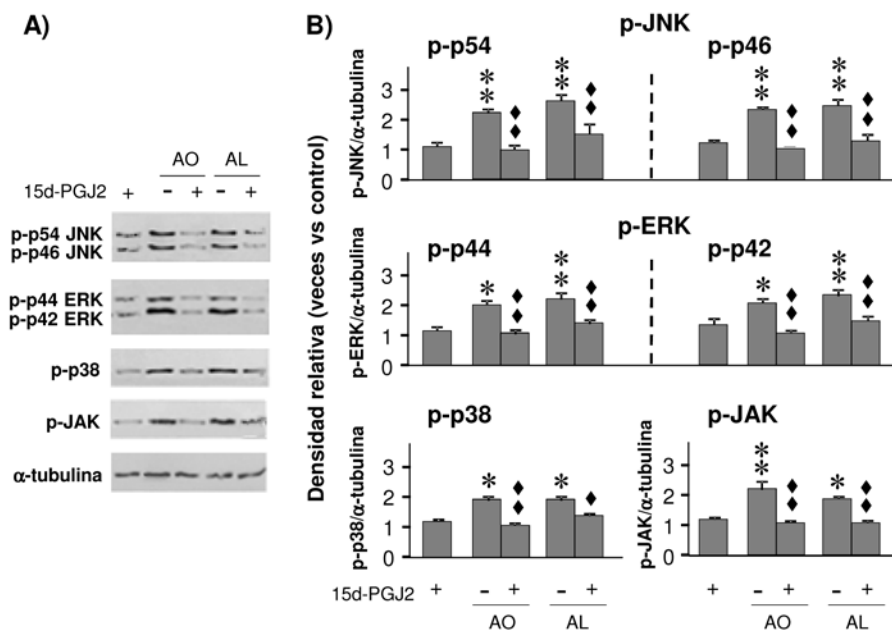
A pesar del efecto represor inducido por la presencia de los inhibidores de MAPKs y JAK, los niveles nucleares de p65 y p-STAT3, así como la expresión de la quimiocina CCL2 se mostraron todavía significativamente más altos que en acinos control.



**Figura 27. Efecto de los inhibidores de las MAPKs: JNK (SP600125, 50  $\mu\text{M}$ ), ERK (GDC-0994, 50  $\mu\text{M}$ ) y p38 (SB202190, 50  $\mu\text{M}$ ) y de JAK (AG-490, 50  $\mu\text{M}$ ) sobre la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (A:  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , B: p65) y STAT3 (C) y sobre la expresión de ARNm de CCL2 (D) inducida por 300  $\mu\text{M}$  de ácido oleico (AO) o ácido linoleico (AL). (A-C) Se muestran geles representativos de cinco experimentos. El análisis densitométrico de la intensidad de las bandas se expresa como porcentaje de la respuesta máxima de cada proteína normalizada con la concentración de  $\alpha$ -tubulina o lamina B1 (controles de carga proteica para proteínas de los extractos citosólicos y nucleares, respectivamente). (D) Porcentaje de la respuesta máxima del ratio ARNm de CCL2/18S. Los valores representan medias  $\pm$  SEM. El test estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas vs acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y vs acinos tratados con OA o LA ( $\blacklozenge$   $p < 0,01$ ).**



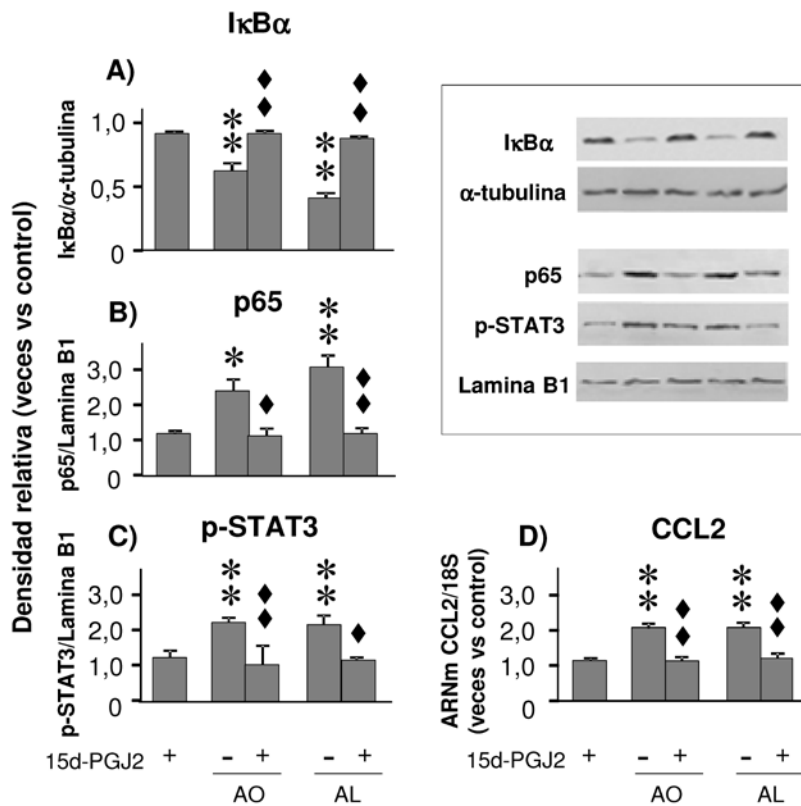
Utilizando el agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2), se analizó el potencial efecto antiinflamatorio resultante de la activación del receptor nuclear PPAR $\gamma$  (Figura 28). La presencia de 15d-PGJ2 en el medio de incubación inhibió significativamente la activación de cada una de las tres MAPKs (JNK, ERK y p38) ( $p < 0,05$ ) así como de JAK ( $p < 0,01$ ), inducida tanto por el ácido oleico como por el ácido linoleico hasta valores no significativamente diferentes de los obtenidos en acinos control. Ningún efecto se observó en acinos incubados en ausencia de ácidos grasos (controles), cuando se añadió 15d-PGJ2.



**Figura 28.** Efecto del agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2, 10  $\mu$ M) sobre la activación de MAPKs (p-JNK, p-ERK y p-p38) y p-JAK inducida por 300  $\mu$ M de ácido oleico (AO) o ácido linoleico (AL). Se muestran Western blots representativos (A) y análisis densitométrico de la intensidad relativa de las bandas (B) de cada p-MAPK o p-JAK normalizada con la concentración de  $\alpha$ -tubulina (controles de carga). Los resultados se expresan como veces de variación vs acinos incubados en ausencia de ácidos grasos (controles). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ) y vs acinos incubados con OA o LA (◆  $p < 0,05$ , ◆◆  $p < 0,01$ ).

Por otra parte, como muestran las Figuras 29A y 29B, el tratamiento de los acinos con 15d-PGJ2 bloqueó significativamente la activación de NF- $\kappa$ B y STAT-3 mediada por ácido oleico o ácido linoleico al prevenir ( $p < 0,01$ ) la reducción de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  citoplasmático ( $p < 0,01$ ) y la migración de p65 al núcleo. El agonista de PPAR $\gamma$  también inhibió significativamente la activación de STAT3 inducida por ácido oleico ( $p < 0,01$ ) o linoleico ( $p < 0,05$ ), hasta valores similares a los controles (Figura 29C). Además, 15d-PGJ2 reprimió ( $p < 0,01$ ) la sobreexpresión

acinar de CCL2 inducida por los ácidos grasos insaturados oleico y linoleico (Figura 29D). Ningún efecto significativo se observó en acinos control.



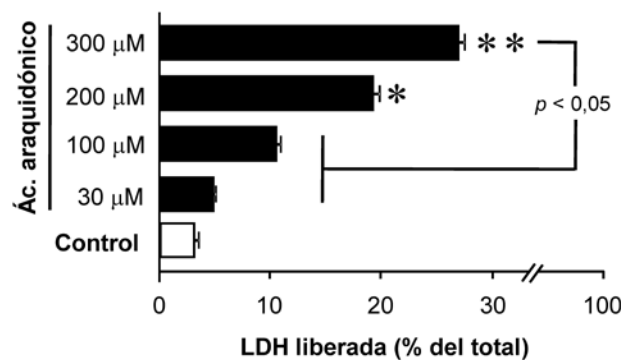
**Figura 29. Efecto del agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2, 10  $\mu$ M) sobre la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (A: I $\kappa$ B $\alpha$ , B: p65) y STAT3 (p-STAT3) (C) y la expresión de ARNm de CCL2 (D) inducida por ácido oleico (AO) o ácido linoleico (AL). Se muestran geles y análisis densitométrico de la intensidad de las bandas de cada proteína normalizadas con los controles de carga  $\alpha$ -tubulina o lamina B1 para los extractos citosólicos o nucleares, respectivamente (A-C). ARNm de CCL2/18S (D). Los resultados se expresan como veces de variación vs acinos incubados en ausencia de ácidos grasos (controles). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El test estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas vs acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y vs acinos incubados con OA o LA ( $\blacklozenge$   $p < 0,05$ ,  $\blacklozenge\blacklozenge$   $p < 0,01$ ).**

#### 4.2. Respuesta al ácido araquidónico

Aunque no es mayoritario, el ácido araquidónico es el AG insaturado más representado en tejido adiposo necrótico después de los ácidos oleico y linoleico. Analizamos la respuesta acinar a ácido araquidónico por ser reconocido de forma general como agente proinflamatorio, y estudiamos su acción de forma independiente porque, a diferencia de los anteriores ácidos grasos, sus efectos inflamatorios se atribuyen generalmente a productos derivados de su metabolismo.

#### 4.2.1. Daño celular

Como muestra la Figura 30, el daño acinar incrementó en presencia de ácido araquidónico de una forma dosis-dependiente. A pesar de que, en comparación con los acinos incubados en ausencia de ácido araquidónico (control), se produjo una mayor liberación de LDH en presencia de ácido araquidónico a concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ , las diferencias no alcanzaron significación estadística. Concentraciones más altas (200  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$ ) indujeron un aumento significativo de la liberación de LDH, resultando la concentración de 300  $\mu\text{M}$  significativamente ( $p < 0,05$ ) más citotóxica que concentraciones  $\leq 100 \mu\text{M}$ .



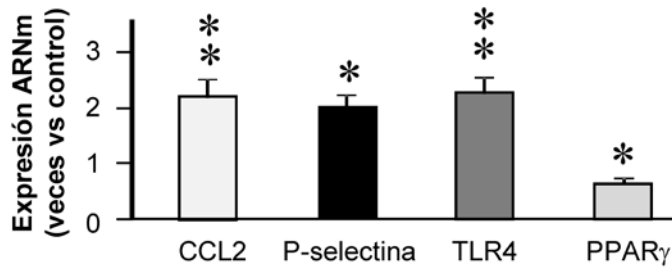
**Figura 30. Lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio en respuesta a diferentes concentraciones (30-300  $\mu\text{M}$ ) de ácido araquidónico.** Los resultados se expresan como % de la actividad LDH total (medida dentro y fuera de las células). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El test estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas vs acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y entre las diferentes concentraciones de ácido araquidónico ( $p < 0,05$ ).

En base a estos resultados se utilizó la concentración de 100  $\mu\text{M}$  en el resto de experimentos, para que la acción citotóxica no interfiriera con los mecanismos de la respuesta inflamatoria en acinos pancreáticos.

#### 4.2.2. Respuesta inflamatoria

##### 4.2.2.1. Expresión de genes

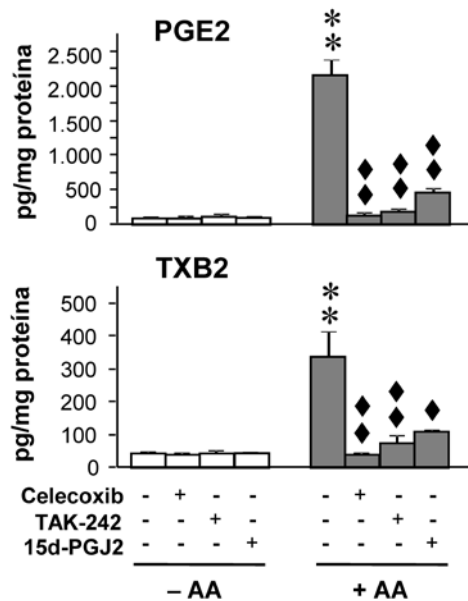
Acinos incubados con 100  $\mu\text{M}$  de ácido araquidónico mostraron un aumento significativo de la expresión del ARNm de CCL2 ( $p < 0,01$ ), P-selectina ( $p < 0,05$ ) y TLR4 ( $p < 0,01$ ) en comparación con acinos incubados en ausencia de dicho AG (control). Además, en respuesta a 100  $\mu\text{M}$  de ácido araquidónico también se observó un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) de la expresión de PPAR $\gamma$  (Figura 31).



**Figura 31. Expresión de ARNm de CCL2, P-selectina, TLR4 y PPAR $\gamma$  en respuesta a ácido araquidónico (100  $\mu$ M).** Los resultados (ARNm de cada gen/18S) se expresan como veces de variación vs acinos incubados en ausencia de ácido araquidónico (control). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.2.2.2. Producción de eicosanoides

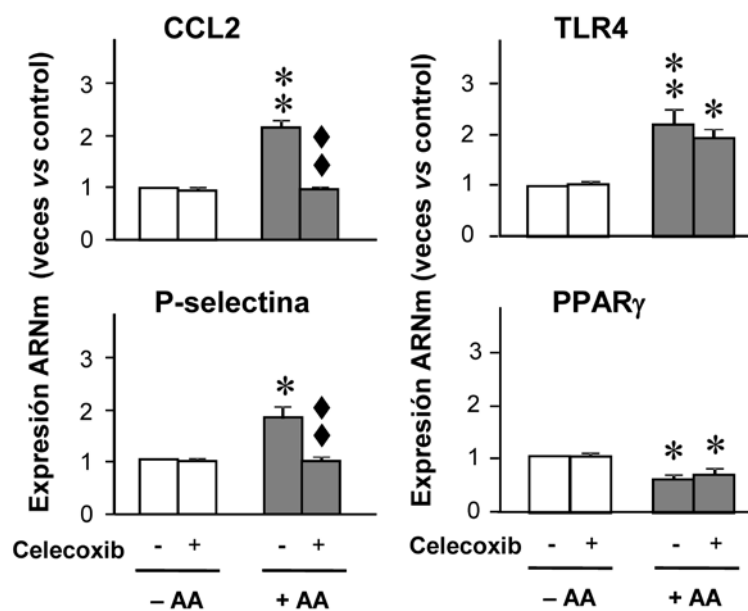
Acinos pancreáticos expuestos a 100  $\mu$ M de ácido araquidónico liberaron al medio de cultivo concentraciones significativamente ( $p < 0,01$ ) elevadas de los eicosanoides PGE2 y TXB2. La producción de ambos eicosanoides se inhibió significativamente cuando la incubación con ácido araquidónico se llevó a cabo en presencia del inhibidor de la ciclooxigenasa-2 (Celecoxib) ( $p < 0,01$ ), el inhibidor de TLR4 (TAK-242) ( $p < 0,01$ ) o el agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2) ( $p < 0,05$ ). La adición de estos compuestos a acinos pancreáticos incubados en ausencia de ácido araquidónico no produjo ningún efecto (Figura 32).



**Figura 32. Producción de prostaglandina E2 (PGE2) y tromboxano B2 (TXB2) en acinos incubados en ausencia (controles) o presencia de ácido araquidónico (AA) (100  $\mu$ M).** Efectos del inhibidor de la ciclooxigenasa-2 (Celecoxib, 10  $\mu$ M), del inhibidor de TLR4 (TAK-242, 5  $\mu$ M) o del agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2, 10  $\mu$ M). Los resultados se expresan como pg/mg proteína. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El test estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas vs acinos control (\*\*  $p < 0,01$ ) y vs acinos incubados solo con AA ( $\blacklozenge p < 0,05$ ,  $\blacklozenge p < 0,01$ ).

#### 4.2.2.3. Papel de los eicosanoides

Los resultados obtenidos con el inhibidor de la ciclooxigenasa-2 (Celecoxib) se muestran en la Figura 33. La presencia de Celecoxib en el medio de incubación no produjo ninguna variación en la expresión de CCL2 ni P-selectina en acinos control. Por el contrario, Celecoxib reprimió la sobreexpresión de ambos mediadores inflamatorios inducida por ácido araquidónico hasta valores similares a los observados en acinos control. Sin embargo, la sobreexpresión de ARNm de TLR4 y el descenso en la expresión de PPAR $\gamma$  que se observaron en respuesta a 100  $\mu$ M de ácido araquidónico no variaron en presencia de Celecoxib en el medio de incubación.

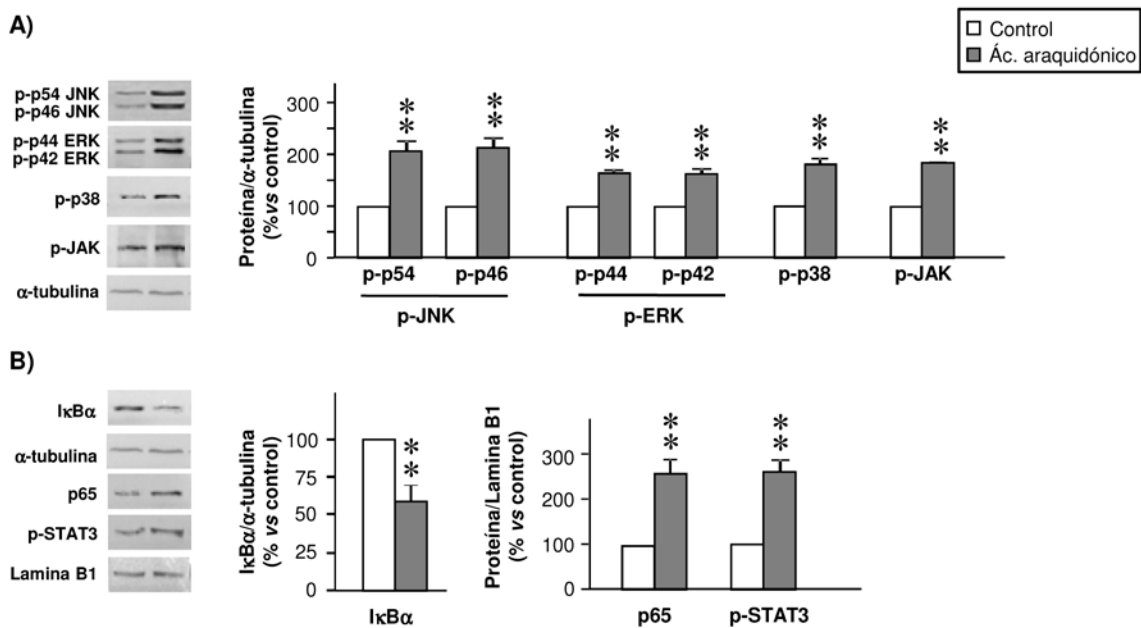


**Figura 33.** Efecto del inhibidor de ciclooxigenasa-2 (Celecoxib, 10  $\mu$ M) sobre la expresión de ARNm de CCL2, P-selectina, TLR4 y PPAR $\gamma$  en acinos incubados en ausencia (controles) o presencia de ácido araquidónico (AA) (100  $\mu$ M). Los resultados (ARNm de cada gen/18S) se expresan como veces de variación vs acinos control. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con AA ( $\blacklozenge\blacklozenge$   $p < 0,01$ ).

#### 4.2.2.4. Rutas de señalización

Los resultados de la activación de MAPKs (p38, JNK y ERK) y JAK en respuesta a ácido araquidónico se muestran en la Figura 34A. La incubación de acinos pancreáticos con ácido araquidónico resultó en una fosforilación significativa ( $p < 0,01$ ) de las cuatro cinasas en comparación con acinos incubados en ausencia de araquidónico (control).

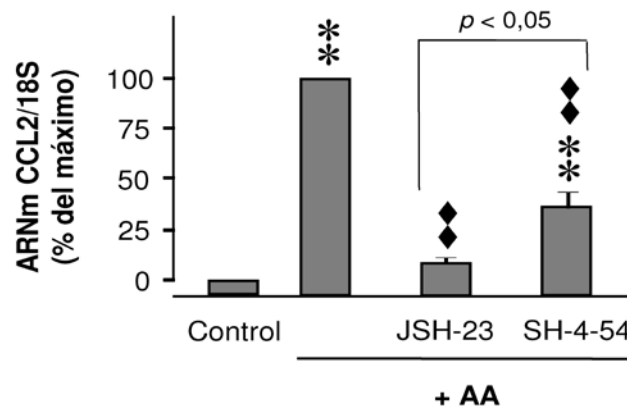
La Figura 34B muestra los resultados de western-blots realizados para estudiar la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$  citoplasmático y p65 nuclear) y STAT3 en respuesta a 100  $\mu$ M de ácido araquidónico. La presencia de este AG en el medio de incubación produjo en acinos una significativa ( $p < 0,01$ ) degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y un aumento ( $p < 0,01$ ) de p65 en el núcleo, indicando una activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Asimismo, se comprobó un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de la fosforilación de STAT3 en acinos incubados con ácido araquidónico, indicativo de la activación de este factor de transcripción.



**Figura 34. Formas fosforiladas de las MAPKs (p-JNK, p-ERK, p-p38) y p-JAK (A) y activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$  y p65) y STAT3 (p-STAT3) (B) en acinos incubados en ausencia (controles) o presencia de ácido araquidónico (100  $\mu$ M). Se muestran geles representativos y los resultados del análisis densitométrico de la intensidad relativa de las bandas de cada proteína corregida con el control de carga ( $\alpha$ -tubulina y lamina B1 para extractos citoplasmáticos y nucleares, respectivamente), expresados como % de variación vs acinos control. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico t-Student reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*\*  $p < 0,01$ ).**

Para valorar la implicación de NF- $\kappa$ B y STAT3 en la sobreexpresión acinar de ARNm de CCL2 inducida por ácido araquidónico, se utilizaron de forma individual, inhibidores específicos de ambos factores de transcripción (Figura 35). La preincubación de acinos pancreáticos con el inhibidor de NF- $\kappa$ B (JSH-23) previno la expresión de CCL2 inducida por ácido araquidónico, mientras que la inhibición de STAT3 (SH-4-54), aunque redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) la expresión de CCL2 inducida por ácido araquidónico, los valores resultaron todavía significativamente más

altos ( $p < 0,01$ ) que los obtenidos en acinos incubados en ausencia de ácido araquidónico (control).



**Figura 35. Efecto de los inhibidores de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (JSH-23, 30  $\mu$ M) y STAT3 (SH-4-54, 1  $\mu$ M) sobre la expresión de ARNm de CCL2 en respuesta a 100  $\mu$ M de ácido araquidónico (AA).** Los resultados se expresan como porcentaje de la respuesta máxima del ratio ARNm CCL2/18S. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos incubados en ausencia de ácido araquidónico (control) (\*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con AA (◆◆  $p < 0,01$ ).

Con el fin de determinar el grado de implicación de cada una de las MAPKs analizadas y de la JAK en la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3, así como en la expresión de CCL2 inducidas por ácido araquidónico, se realizaron cultivos en presencia de los respectivos inhibidores específicos. El pretratamiento de acinos con los inhibidores de JNK (SP600125) o de p38 (SB202190) redujo significativamente la activación de NF- $\kappa$ B (Figuras 36A y 36B) y de STAT3 (Figura 36C) inducida por ácido araquidónico, si bien los valores obtenidos todavía resultaron significativamente ( $p < 0,05$ ) más altos que los observados en acinos incubados en ausencia de ácido araquidónico (control). La inhibición de ERK con GDC-0994 previno totalmente la activación de los dos factores de transcripción, mientras que la presencia de AG-490 (inhibidor de JAK) en el medio de incubación, aunque redujo la activación de ambos factores de transcripción inducida por ácido araquidónico, sólo alcanzó significación estadística ( $p < 0,01$ ) para STAT3.

El pretratamiento con los inhibidores de MAPKs o de JAK también redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) el aumento de expresión de ARNm de CCL2 inducido por ácido araquidónico (Figura 36D), aunque los niveles de expresión de esta quimiocina resultaron aun significativamente ( $p < 0,01$ ) más altos que en acinos control.

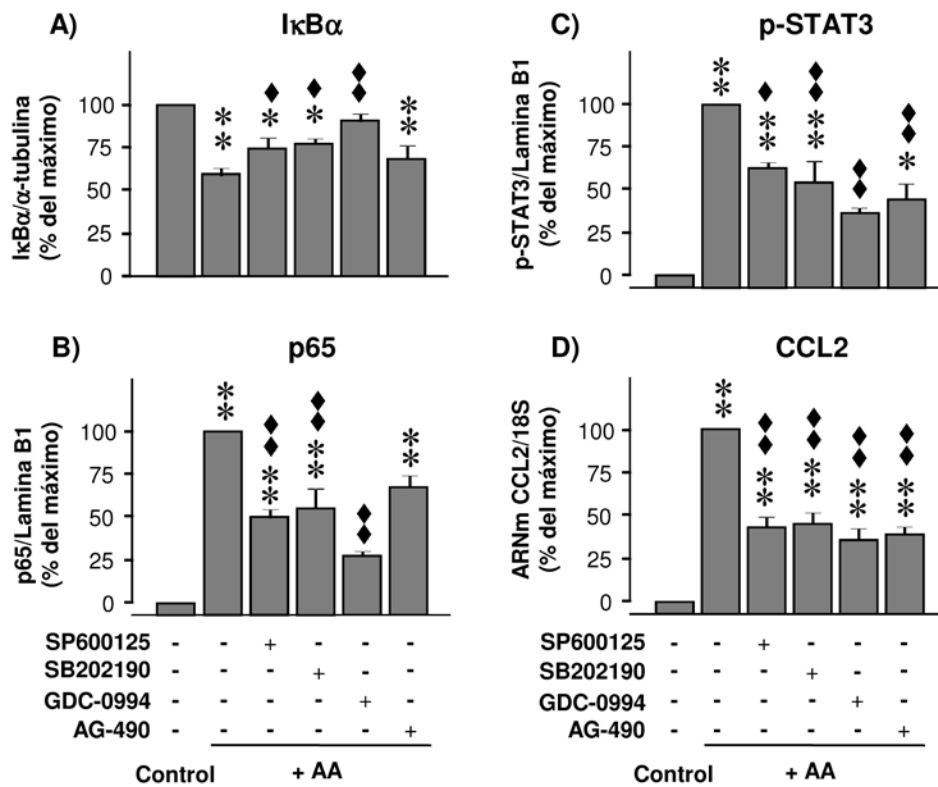
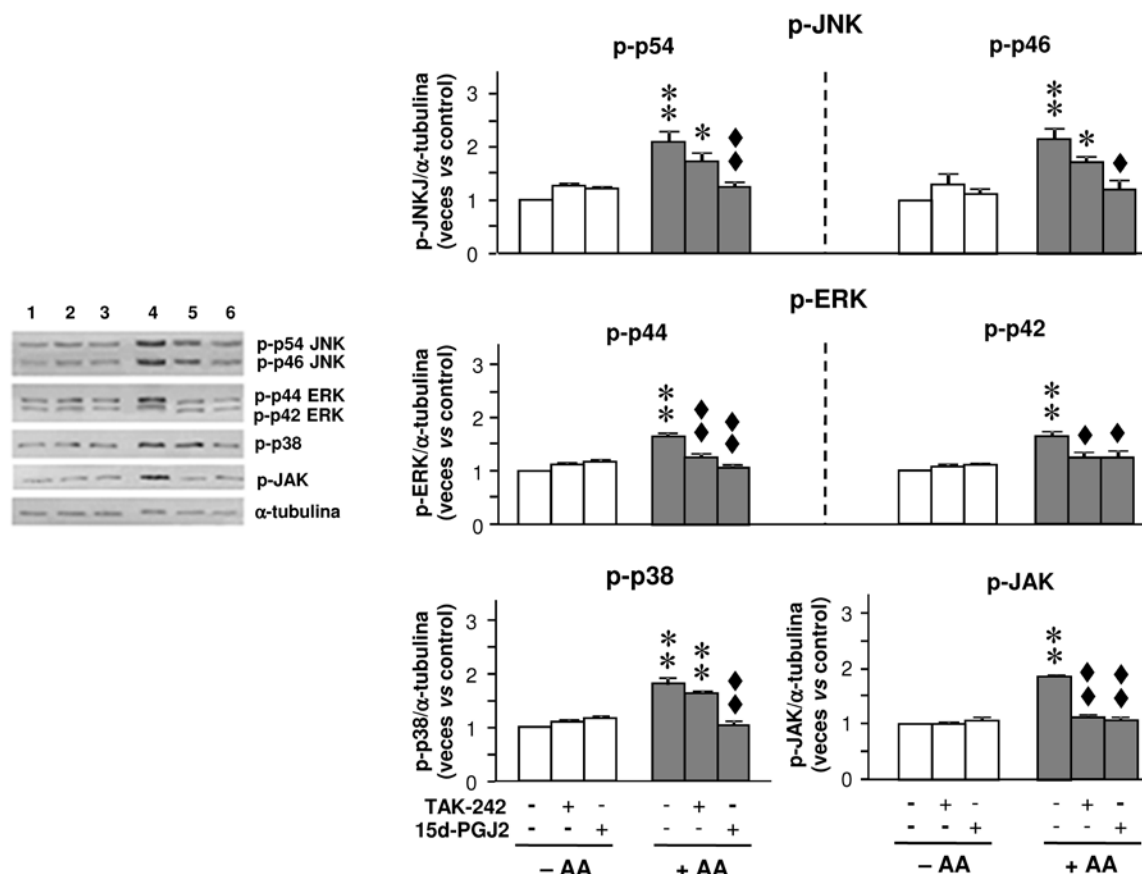


Figura 36. Efecto de los inhibidores de las MAPKs: JNK (SP600125, 50  $\mu$ M), p38 (SB202190, 50  $\mu$ M) y ERK (GDC-0994, 50  $\mu$ M) y JAK (AG-490, 50  $\mu$ M) sobre la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (A: I $\kappa$ B $\alpha$ , B: p65) y STAT3 (C) y sobre la expresión de ARNm de CCL2 (D) en respuesta a 100  $\mu$ M de ácido araquidónico (AA). Resultados del análisis densitométrico de la intensidad de las bandas de cada proteína corregida con el control de carga (A-C) y expresión del ratio ARNm CCL2/18S (D). Los resultados se expresan como porcentaje de la respuesta máxima. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos independientes. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos incubados en ausencia de ácido araquidónico (control) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con AA ( $\blacklozenge$   $p < 0,05$ ,  $\blacklozenge\blacklozenge$   $p < 0,01$ ).

#### 4.2.2.5. Papel del TLR4 y PPAR $\gamma$

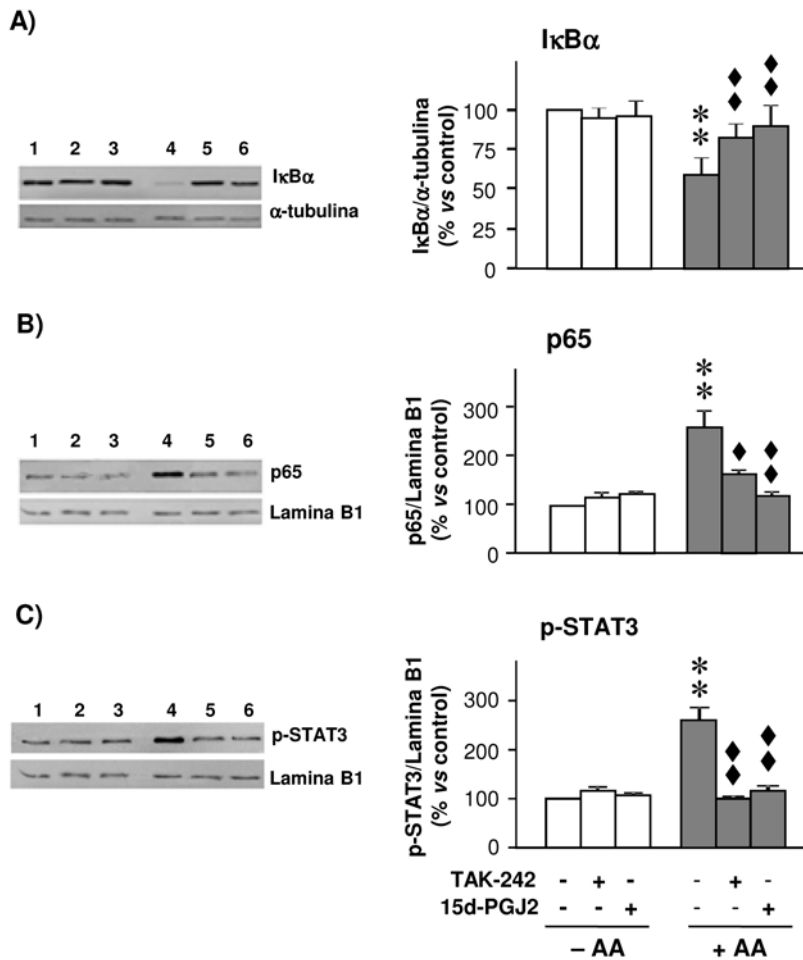
La presencia del inhibidor de TLR4 (TAK-242) o del agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2) en el medio de incubación no produjo ningún cambio en la fosforilación de MAPKs (JNK, ERK, p38) ni de JAK en acinos control. En acinos incubados con ácido araquidónico, TAK-242 inhibió la fosforilación de ERK y JAK, mientras que no ejerció ningún efecto significativo sobre la activación de JNK ni de p38 inducida por ácido araquidónico. Por su parte, la adición al medio de cultivo de 15d-PGJ2 resultó en la inhibición de la fosforilación de las tres MAPKs y de JAK hasta valores no significativamente diferentes de los controles (Figura 37).





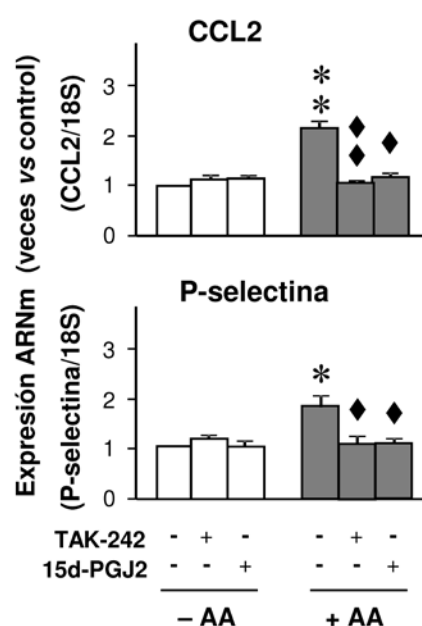
**Figura 37.** Efecto del inhibidor de TLR4 (TAK-242, 5  $\mu$ M) y del agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2, 10  $\mu$ M) sobre la fosforilación de las MAPKs (p-JNK, p-ERK y p-p38) y p-JAK en acinos incubados en ausencia (controles) o presencia de ácido araquidónico (AA) (100  $\mu$ M). Western blots representativos e histogramas que representan el análisis densitométrico de la intensidad relativa de cada proteína corregida con el control de carga ( $\alpha$ -tubulina) de cinco experimentos independientes (1: acinos control; 2: acinos control incubados con TAK-242; 3: acinos control incubados con 15d-PGJ2; 4: acinos incubados con AA; 5: acinos incubados con AA en presencia de TAK-242; 6: acinos incubados con AA en presencia de 15d-PGJ2). Los valores representan medias  $\pm$  SEM. El análisis estadístico ANOVA seguido de test de Tukey reveló diferencias significativas vs acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y vs acinos incubados con AA (♦  $p < 0,05$ , ♦♦  $p < 0,01$ ).

La activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, valorado por los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  citosólico (Figura 38A) y de p65 nuclear (Figura 38B) y STAT3 (Figura 38C) inducida por ácido araquidónico se previno eficazmente en presencia de TAK-242 o 15d-PGJ2, resultando valores similares a los observados en acinos control.



**Figura 38. Efecto del inhibidor de TLR4 (TAK-242, 5  $\mu$ M) y del agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2, 10  $\mu$ M) sobre la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (A: I $\kappa$ B $\alpha$ , B: p65) y STAT3 (p-STAT3) (C) en acinos incubados en ausencia (controles) o presencia de ácido araquidónico (AA) (100  $\mu$ M). Western blots representativos e histogramas que representan el análisis densitométrico de la intensidad relativa de cada proteína corregida con el control de carga ( $\alpha$ -tubulina y lamina B1 para extractos citoplasmáticos y nucleares, respectivamente) de cinco experimentos independientes (1: acinos control; 2: acinos control incubados con TAK-242; 3: acinos control incubados con 15d-PGJ2; 4: acinos incubados con AA; 5: acinos incubados con AA en presencia de TAK-242; 6: acinos incubados con AA en presencia de 15d-PGJ2 y AA). Los valores representan medias  $\pm$  SEM. El análisis estadístico ANOVA seguido de test de Tukey reveló diferencias significativas vs acinos control (\*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados solo con AA ( $\blacklozenge p < 0,05$ ,  $\blacklozenge\blacklozenge p < 0,01$ ).**

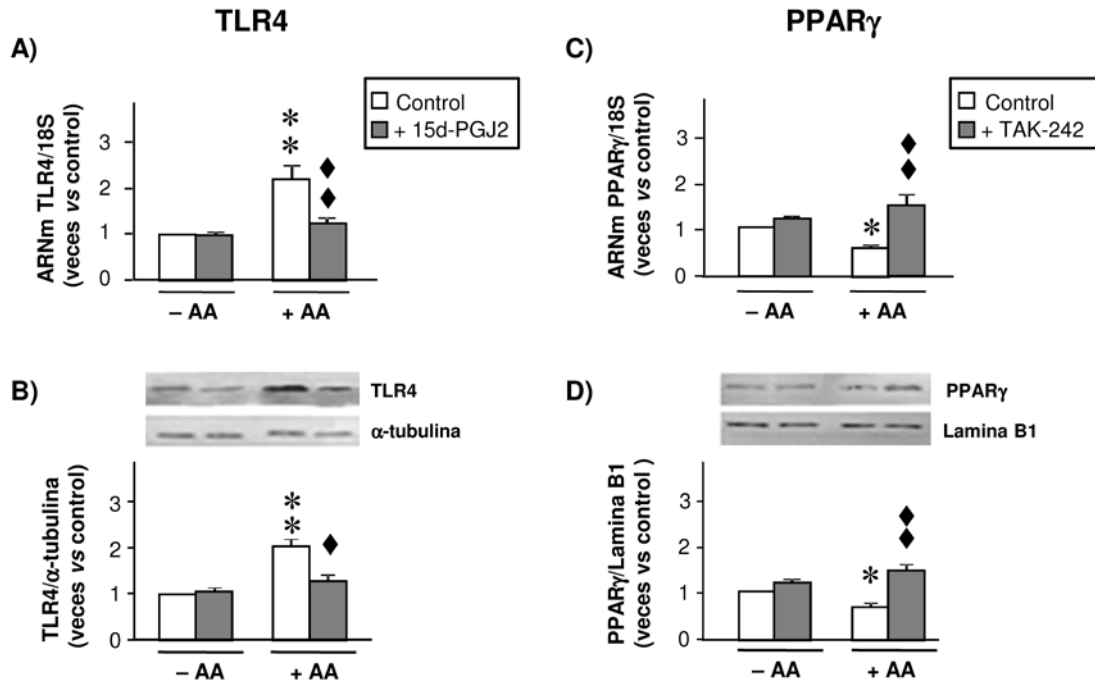
Al analizar la expresión de CCL2 y P-selectina (Figura 39), se comprobó que la presencia de TAK-242 o de 15d-PGJ2 en el medio de incubación reprimieron significativamente la expresión génica de ambos mediadores inducida por ácido araquidónico, hasta valores no significativamente diferentes de los valores en acinos control.



**Figura 39.** Efecto del inhibidor de TLR4 (TAK-242, 5  $\mu\text{M}$ ) y del agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2, 10  $\mu\text{M}$ ) sobre la expresión de ARNm de CCL2 y P-selectina en acinos incubados en ausencia (controles) o presencia de ácido araquidónico (AA) (100  $\mu\text{M}$ ). Los resultados (ARNm de CCL2 o de P-selectina/18S) se expresan como veces de variación vs acinos controles. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido de test de Tukey reveló diferencias significativas vs acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con AA (♦  $p < 0,05$ , ♦♦  $p < 0,01$ ).

Para analizar una posible regulación cruzada entre las rutas TLR4 y PPAR $\gamma$  en respuesta a ácido araquidónico, se analizó la expresión de ARNm (Figuras 40A y 40C) y expresión proteica (Figuras 40B y 40D) de TLR4 y PPAR $\gamma$  en presencia de 15d-PGJ2 o TAK-242, respectivamente. La activación de PPAR $\gamma$  por 15d-PGJ2, reprimió la expresión génica ( $p < 0,01$ ) y la acumulación de proteína ( $p < 0,05$ ) de TLR4 inducida en respuesta a ácido araquidónico.

Por otro lado, la presencia de TAK-242 en el medio de incubación previno ( $p < 0,01$ ) el descenso en los niveles de expresión de PPAR $\gamma$  observados en acinos con ácido araquidónico. De igual manera, el inhibidor de TLR4 impidió el descenso de PPAR $\gamma$  a nivel nuclear inducido por ácido araquidónico.



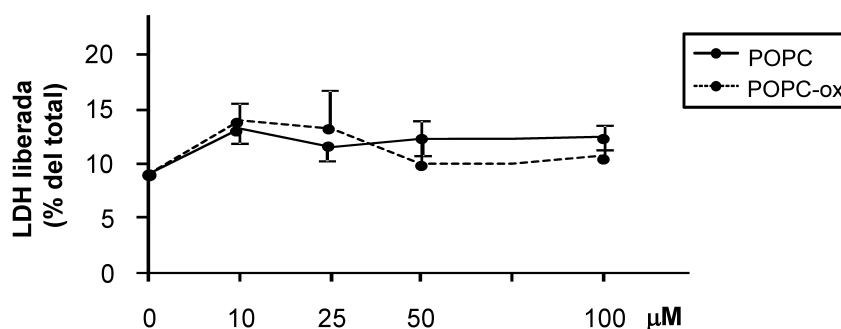
**Figura 40.** Efecto del agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2, 10  $\mu$ M) sobre la expresión de ARNm (A) y de proteína (B) de TLR4 y efecto del inhibidor de TLR4 (TAK-242, 5  $\mu$ M) sobre la expresión de ARNm (C) y de proteína (D) de PPAR $\gamma$  en acinos incubados en ausencia (controles) o presencia de ácido araquidónico (AA) (100  $\mu$ M). Los resultados (A, C) (ARNm de TLR4 o de PPAR $\gamma$ /18S) se expresan como veces de variación vs acinos incubados en ausencia de AA (control). En (B, D) se muestran geles representativos y los resultados del análisis densitométrico de la intensidad relativa de las bandas de TLR4 o PPAR $\gamma$  corregida con el control de carga  $\alpha$ -tubulina o lamina B1, respectivamente, expresados como % de variación vs acinos control. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido de test de Tukey reveló diferencias significativas vs acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y vs acinos incubados con AA (♦  $p < 0,05$ , ♦♦  $p < 0,01$ ).

## 5. ACCIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS EN ACINOS PANCREÁTICOS: EFECTOS DEL 1-PALMITOIL-2-OLEOIL-SN-GLICERO-3-FOSFOCOLINA (POPC)

Analizamos los efectos de POPC, por ser el FL compuesto por los ácidos grasos mayoritarios observados en el análisis de transesterificación y con el grupo polar más representado en la fracción de FLs. Puesto que los FLs están expuestos a reacciones oxidativas durante PA, estudiamos los efectos de POPC en su forma natural y en su forma oxidada (POPC-ox).

### 5.1. Daño celular

La actividad LDH liberada al exterior celular (Figura 41) en acinos pancreáticos incubados con dosis crecientes (10 – 100  $\mu$ M) de POPC o POPC-ox no resultó estadísticamente diferente de acinos incubados en ausencia de FLs (control).



**Figura 41.** Lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio en respuesta a 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC) o POPC oxidado (POPC-ox) (10-100 μM). Los resultados se expresan como % de la actividad LDH total (medida dentro y fuera de las células). Los valores representan medias ± SEM de cinco experimentos. El test estadístico ANOVA no reveló diferencias significativas.

Con fin de comprobar un posible efecto dosis-dependiente, elegimos la dosis más baja testada (10 μM) y una intermedia (50 μM) de entre las testadas, para llevar a cabo los estudios de la respuesta inflamatoria sobre acinos pancreáticos.

## 5.2. Respuesta inflamatoria

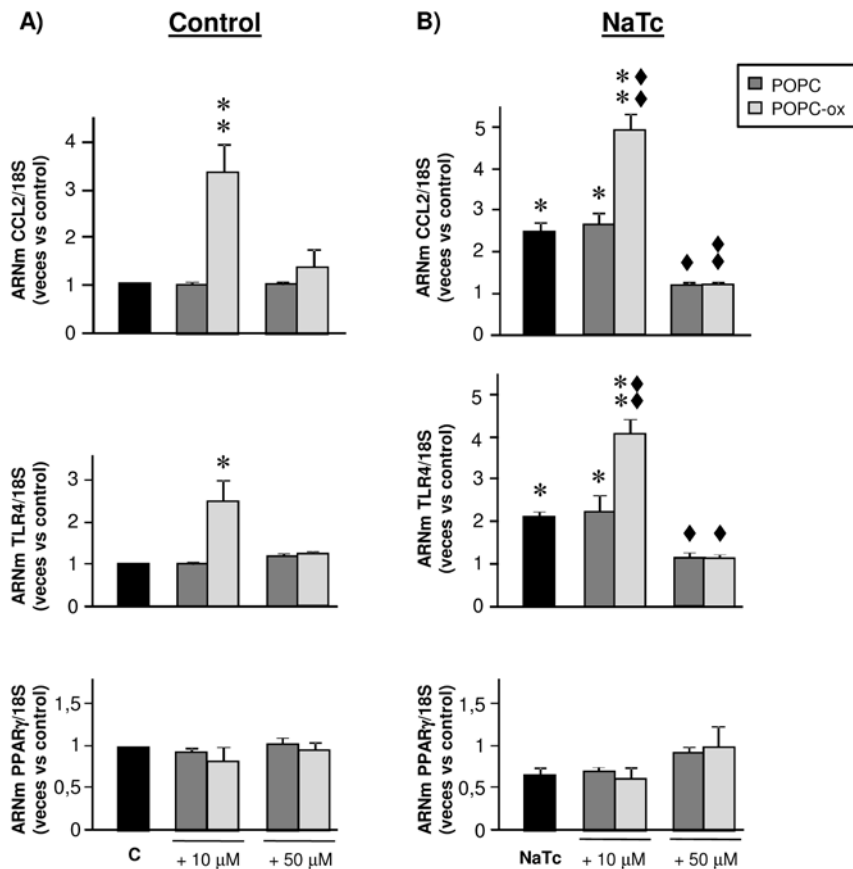
Se analizó en acinos control y en acinos con una situación proinflamatoria inducida por exposición a taurocolato sódico (NaTc, 0,25%).

### 5.2.1. Expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria

El análisis de expresión de ARNm de CCL2 y TLR4 en acinos pancreáticos control incubados con POPC o POPC-ox (Figura 42A) reveló un aumento significativo de la expresión de ambos genes en presencia de 10 μM de POPC-ox, pero no de POPC. Ningún efecto se observó en respuesta a 50 μM de POPC o POPC-ox.

La incubación de acinos pancreáticos con NaTc (Figura 42B) resultó en un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la expresión de CCL2 y TLR4. La presencia de 10 μM de POPC en el medio de incubación no modificó la respuesta observada con NaTc, mientras que POPC-ox potenció significativamente ( $p < 0,01$ ) la expresión de ambos genes, detectándose valores aproximadamente dos veces más altos que en acinos estimulados con NaTc. Por el contrario, ambas muestras de FLs, añadidas a la concentración de 50 μM, inhibieron totalmente la sobreexpresión de CCL2 y TLR4 inducida por NaTc hasta valores control.

El análisis de la expresión de PPAR $\gamma$  reveló que la presencia de POPC o POPC-ox en el medio de incubación de acinos pancreáticos no indujo cambios significativos en la expresión de ARNm de PPAR $\gamma$  a ninguna de las dos concentraciones analizadas. NaTc redujo la expresión acinar de PPAR $\gamma$ , aunque los valores no alcanzaron significación estadística respecto a acinos control. Esta tendencia a una reducción de la expresión de PPAR $\gamma$  se mantuvo cuando al medio de incubación se añadió POPC o POPC-ox a la concentración de 10  $\mu$ M. La exposición de acinos pancreáticos a NaTc y a 50  $\mu$ M de POPC o POPC-ox aumentó la expresión génica de PPAR $\gamma$  hasta valores próximos a los observados en acinos control, aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la observada en ausencia de FLs.

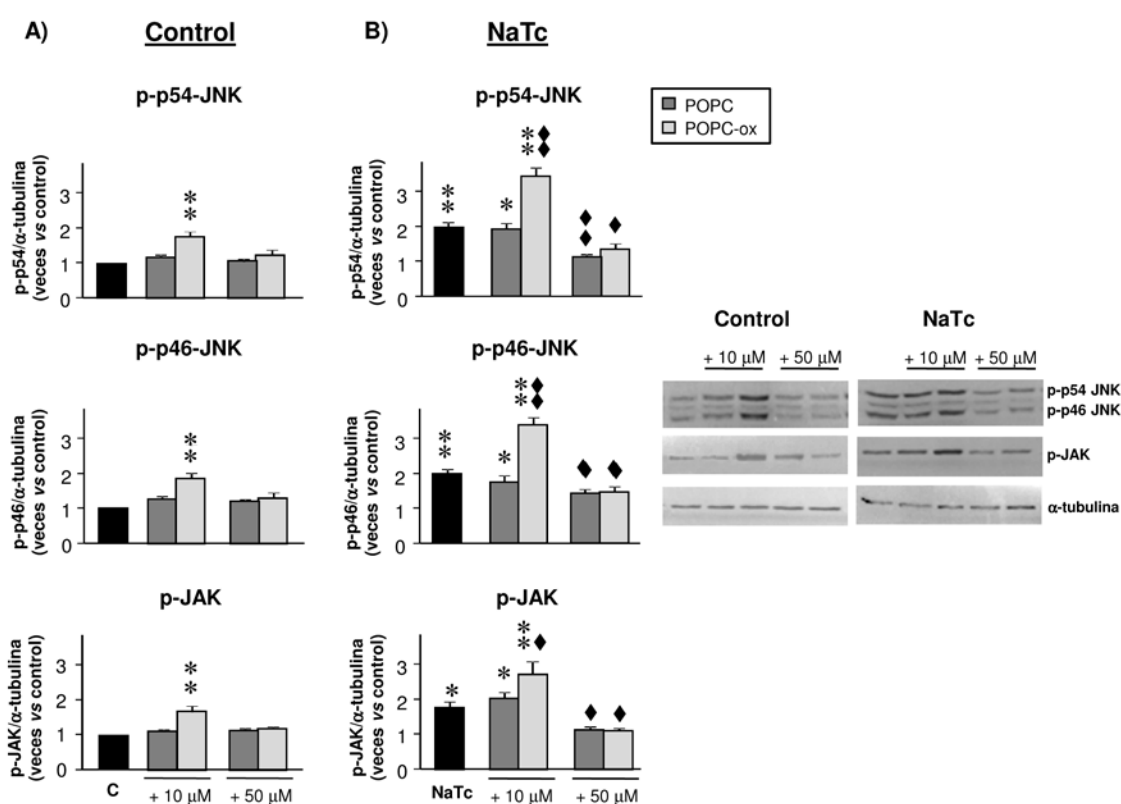


**Figura 42.** Expresión de ARNm de CCL2, TLR4 y PPAR $\gamma$  en respuesta a 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC) o POPC oxidado (POPC-ox) (10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) en acinos control (A) o acinos incubados con taurocolato sódico (NaTc, 0,25 %) (B). Los resultados (ARNm de cada gen/18S) se expresan como veces de variación vs acinos incubados en ausencia de POPC, POPC-ox y NaTc (controles). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con NaTc ( $\blacklozenge$   $p < 0,05$ ,  $\blacklozenge\blacklozenge$   $p < 0,01$ ).

### 5.2.2. Rutas de señalización

Se analizó JNK, como representante de MAPKs, y JAK.

Como se muestra en la Figura 43, a la concentración más baja testada (10  $\mu$ M), únicamente POPC-ox indujo un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de la fosforilación de JNK (p54, p46)-MAPK y JAK tanto en acinos control como en acinos estimulados con NaTc. Por el contrario, la presencia de 50  $\mu$ M tanto de POPC como de POPC-ox en el medio de incubación redujo la fosforilación de sendas cinasas inducida por NaTc hasta valores control.

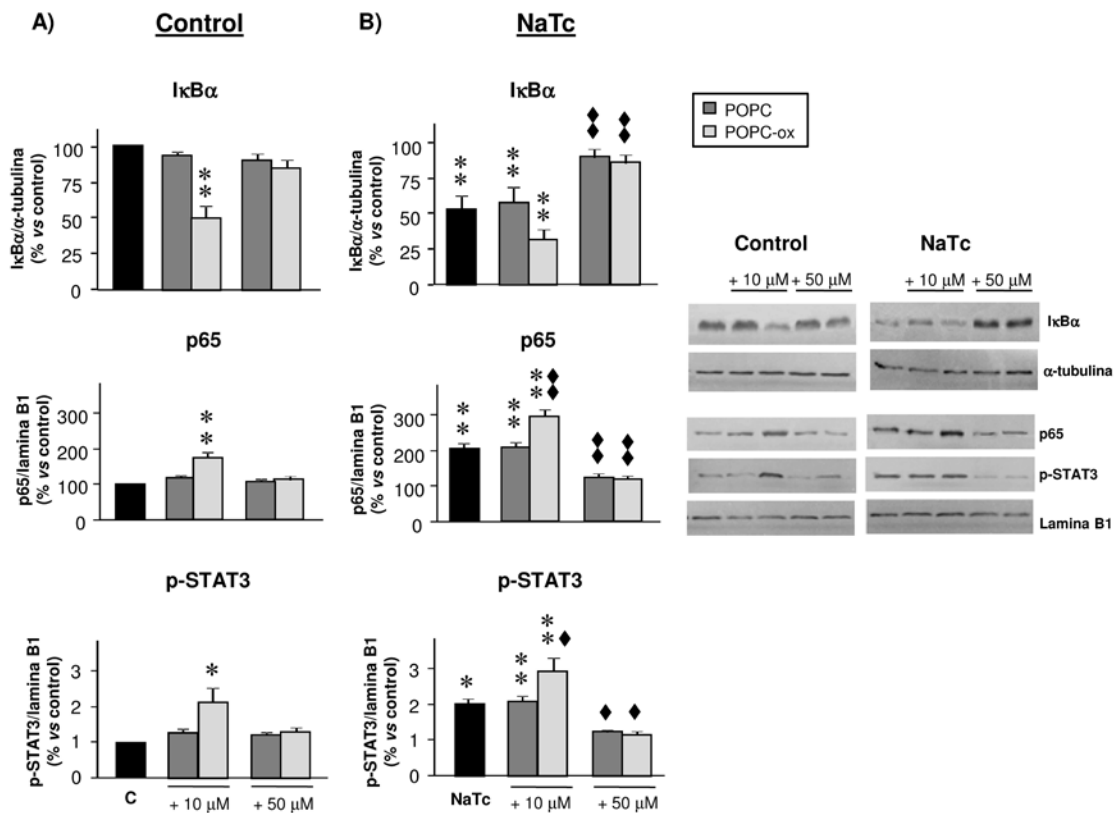


**Figura 43.** Formas fosforiladas de p-JNK (p54, p46) y p-JAK en respuesta a 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC) o POPC oxidado (POPC-ox) (10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) en acinos control (A) o acinos incubados con taurocolato sódico (NaTc, 0,25%) (B). Western blots representativos e histogramas que representan el análisis densitométrico de la intensidad relativa de las bandas de cada proteína, corregida con el control de carga  $\alpha$ -tubulina, expresando los resultados como veces de variación vs acinos incubados en ausencia de POPC, POPC-ox y NaTc (controles) de cinco experimentos. Los valores representan medias  $\pm$  SEM. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con NaTc ( $\blacklozenge$   $p < 0,05$ ,  $\blacklozenge\blacklozenge$   $p < 0,01$ ).

El análisis de los factores de transcripción reveló que, tanto en acinos controles como en acinos estimulados con NaTc, solo la forma oxidada de POPC a la concentración de 10  $\mu$ M, indujo un aumento significativo de la activación del factor de

transcripción NF- $\kappa$ B, valorado tanto por la degradación citosólica de I $\kappa$ B $\alpha$  ( $p < 0,01$ ) como por la acumulación nuclear de p65 ( $p < 0,01$ ), y del factor de transcripción STAT3 ( $p < 0,05$ ) (Figura 44).

Tanto POPC como POPC-ox añadidos a la concentración de 50  $\mu$ M no ejercieron ningún efecto en acinos control. Sin embargo, a esta concentración, ambas formas de POPC redujeron significativamente tanto la activación de NF- $\kappa$ B, reprimiendo la migración de p65 al núcleo ( $p < 0,01$ ), como de STAT3 ( $p < 0,05$ ) en acinos estimulados con NaTc hasta inhibirla totalmente.



**Figura 44. Activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (A: I $\kappa$ B $\alpha$ , B: p65) y STAT3 (p-STAT3) (C) en respuesta a 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC) o POPC oxidado (POPC-ox) (10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) en acinos control (A) o acinos incubados con taurocolato sódico (NaTc, 0,25%) (B). Western blots representativos e histogramas que representan el análisis densitométrico de la intensidad relativa de las bandas de cada proteína corregida con el control de carga ( $\alpha$ -tubulina y lamina B1 para extractos citoplasmáticos y nucleares, respectivamente), expresado los resultados como veces de variación vs acinos incubados en ausencia de POPC, POPC-ox y NaTc (controles). Los valores representan medias  $\pm$  SEM. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con NaTc (◆  $p < 0,05$ , ◆◆  $p < 0,01$ ).**

Dado que, en función de la concentración, se observaron respuestas pro o antiinflamatorias a POPC o POPC-ox, a continuación se exponen de forma independiente los resultados obtenidos con el uso de inhibidores para confirmar los

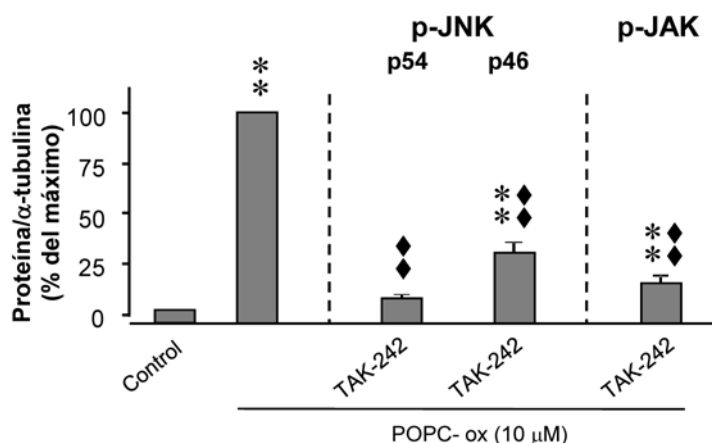


mecanismos involucrados en las rutas de señalización implicadas en cada tipo de respuesta.

### 5.2.2.1. Efectos inducidos por baja concentración del fosfolípido

Se llevó a cabo sobre acinos control.

A fin de valorar si la activación de TLR4 estaba implicada en la activación de JNK-MAPK y JAK observada en respuesta a 10  $\mu$ M de POPC oxidado, analizamos la activación de ambas cinasas en acinos incubados en presencia del inhibidor de TLR4, TAK-242. La inhibición de TLR4 resultó en una fosforilación significativamente menor de JNK-MAPK y JAK, aunque no previno totalmente su activación, observando valores de p46-p-JNK y p-JAK significativamente más altos que en acinos pancreáticos incubados en ausencia de POPC-ox (control) (Figura 45).

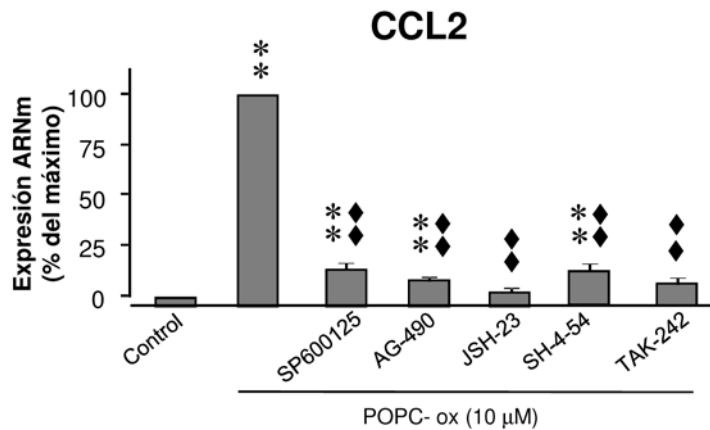


**Figura 45. Efecto del inhibidor de TLR4 (TAK-242, 5  $\mu$ M) sobre la fosforilación de JNK-MAPK (p54, p46) y JAK en acinos control en respuesta a 10  $\mu$ M de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina oxidado (POPC-ox). Los resultados (proteína/ $\alpha$ -tubulina) se expresan como porcentaje de la respuesta máxima. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con POPC-ox (♦♦  $p < 0,01$ ).**

Para determinar la implicación de cinasas (JNK y JAK), de factores de transcripción (NF- $\kappa$ B y STAT3) y de TLR4 en la sobreexpresión de CCL2 inducida en acinos por bajas concentraciones de POPC-ox (10  $\mu$ M), se utilizaron inhibidores específicos cada una de estas rutas de señalización (Figura 46). El pretratamiento con el inhibidor de JNK (SP600125) o de JAK (AG-490) o del factor de transcripción STAT3 (SH-4-54) redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) el aumento de expresión de CCL2 inducido por POPC-ox, aunque los valores obtenidos todavía resultaron

significativamente más altos que en acinos incubados en ausencia de POPC-ox (control).

A su vez, los inhibidores del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (JSH-23) y de la señalización por TLR4 (TAK-242) resultaron eficaces para prevenir la expresión de esta quimiocina inducida por POPC-ox.

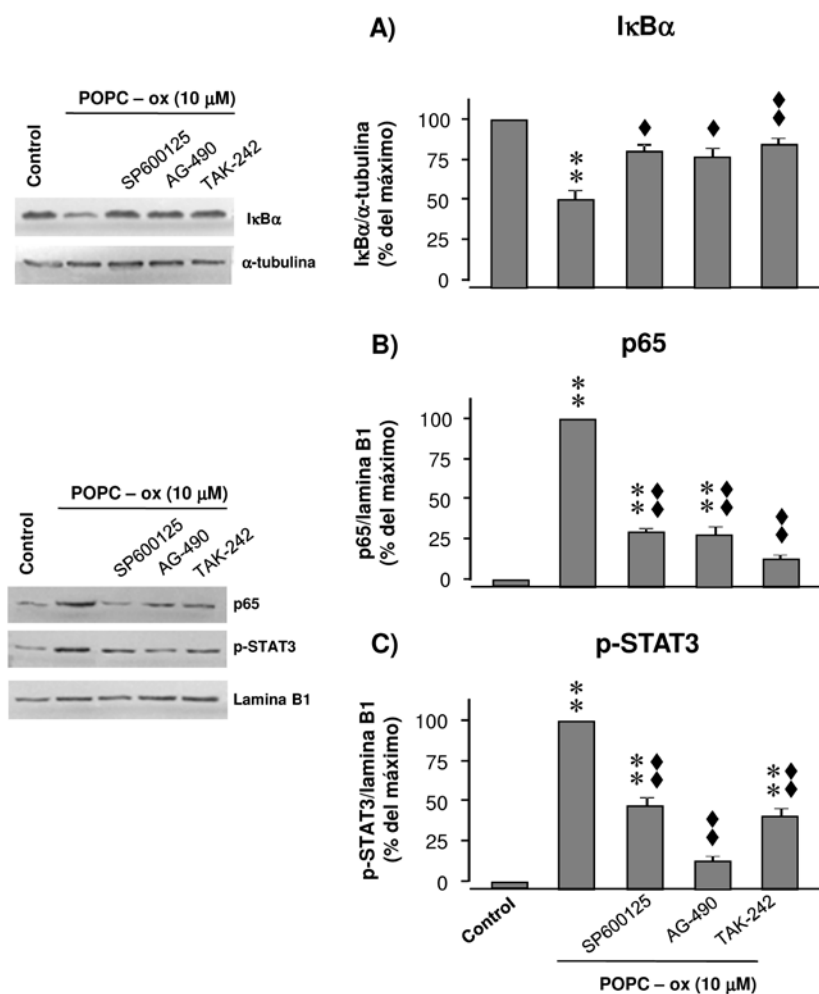


**Figura 46.** Efecto de los inhibidores de JNK (SP600125, 50  $\mu$ M), JAK (AG-490, 50  $\mu$ M), NF- $\kappa$ B (JSH-23, 30  $\mu$ M), STAT3 (SH-4-54, 1  $\mu$ M) o TLR4 (TAK-242, 5  $\mu$ M) sobre la expresión de ARNm de CCL2 en acinos control en respuesta a 10  $\mu$ M de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina oxidado (POPC-ox). Los resultados (ARNm CCL2/18S) se expresan como porcentaje de la respuesta máxima. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con NaTc (♦♦  $p < 0,01$ ).

La Figura 47 muestra los resultados obtenidos con inhibidores específicos para estudiar la participación de las cinasas JNK y JAK, así como de TLR4 en la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3. La inhibición de la fosforilación de JNK, con SP600125, y de JAK, con AG-490, resultó en una significativa menor degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma ( $p < 0,05$ ) acompañada de una reducción significativa de la translocación nuclear de p65 ( $p < 0,01$ ), de lo que se deduce una reducción significativa de la activación de NF- $\kappa$ B inducida por POPC-ox.

Asimismo, la activación de STAT3 inducida por POPC-ox se redujo significativamente en presencia de inhibidores de ambas cinasas, con un efecto más acusado para el inhibidor de JAK.

Por otra parte, la inhibición de la señalización por TLR4, añadiendo TAK-242 al medio de incubación, previno totalmente la activación de, factor de transcripción NF- $\kappa$ B y redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) la activación de STAT3, aunque no la impidió de forma total.



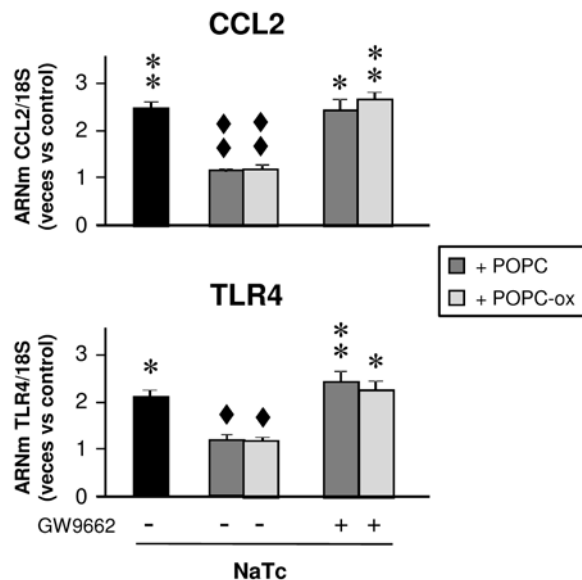
**Figura 47.** Efecto de los inhibidores de JNK (SP600125, 50  $\mu$ M), JAK (AG-490, 50  $\mu$ M) y TLR4 (TAK-242, 5  $\mu$ M) sobre la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (A: I $\kappa$ B $\alpha$ , B: p65) y STAT3 (p-STAT3) (C) en la respuesta de acinos control a POPC oxidado (POPC-ox) (10  $\mu$ M). Se muestran geles representativos y el análisis densitométrico de la intensidad relativa de las bandas de cada proteína corregida con el control de carga citoplasmática ( $\alpha$ -tubulina) o nuclear (lamina B1), expresando los resultados como porcentaje de la respuesta máxima. Los valores representan medias  $\pm$  SEM. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos incubados en ausencia de POPC-ox (control) (\*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con POPC-ox (♦  $p < 0,05$ , ♦♦  $p < 0,01$ ).

### 5.2.2.2. Efectos inducidos por alta concentración del fosfolípido

Para analizar si la respuesta antiinflamatoria observada en acinos estimulados con NaTc incubados con 50  $\mu$ M de POPC o POPC-ox cursa a través de la activación de la ruta PPAR $\gamma$ , se analizó la expresión de ARNm de CCL2 y de TLR4 en acinos expuestos al antagonista de PPAR $\gamma$  (GW9662) (Figura 48). Cuando se añadieron POPC o POPC-ox al cultivo acinar en presencia de GW9662 y NaTc, la expresión de ambos genes aumentó significativamente respecto a acinos pancreáticos incubados

en ausencia del antagonista, resultando en valores próximos a los observados en acinos incubados en ausencia de FLs y NaTc (controles).

De ello se deduce que la presencia de GW9662 en el medio de incubación anuló el efecto antiinflamatorio inducido por los FLs, manteniendo el efecto proinflamatorio en valores no significativamente diferentes de los observados en acinos incubados con NaTc.



**Figura 48. Efecto del antagonista de PPAR $\gamma$  (GW9662) sobre la expresión de ARNm de CCL2 y de TLR4 en acinos estimulados con taurocolato sódico (NaTc, 0,25%) tratados con 50  $\mu$ M de POPC o POPC oxidado (POPC-ox).** Los resultados (ARNm CCL2/18S) se expresan como veces de variación vs acinos incubados en ausencia de NaTc (control). Los valores representan medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto a acinos control (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a acinos incubados con NaTc ( $\blacklozenge\blacklozenge$   $p < 0,01$ ).

## 6. ESTUDIOS *IN VIVO*: TLR4 Y PPAR $\gamma$ COMO DIANAS TERAPÉUTICAS EN PANCREATITIS AGUDA

La Figura 49 recoge resultados relativos a parámetros indicadores de gravedad de PA, obtenidos en ratas con PA inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) mantenida durante 12 h y tratadas con el inhibidor de TLR4 (TAK-242) o con el agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2).

La administración de cualquiera de los dos tratamientos redujo significativamente el incremento de hematocrito ( $p < 0,05$ ), el edema generado en la glándula (valorado como porcentaje de fluido) ( $p < 0,05$ ), así como el aumento del volumen de ascitis ( $p < 0,01$ ) observado en ratas con PA-OBP. El reclutamiento de neutrófilos en páncreas (determinado por actividad MPO) observado en ratas con PA-

OBP se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) tanto con la administración de TAK-242 como de 15d-PGJ2, aunque no consiguieron reprimirlo hasta los valores observados en ratas sin PA (sham).

El significativo incremento en la concentración plasmática de mediadores inflamatorios (IL-1 $\beta$  y de los eicosanoides PGE2 y TXB2) observado en ratas con PA, se redujo significativamente como resultado de la administración de TAK-242 o de 15d-PGJ2 hasta valores no significativamente diferentes de las ratas sham.

Sin embargo, ninguno de los dos tratamientos resultó capaz de reducir la hiperlipasemia observada en ratas con PA tras 12 h de OBP.

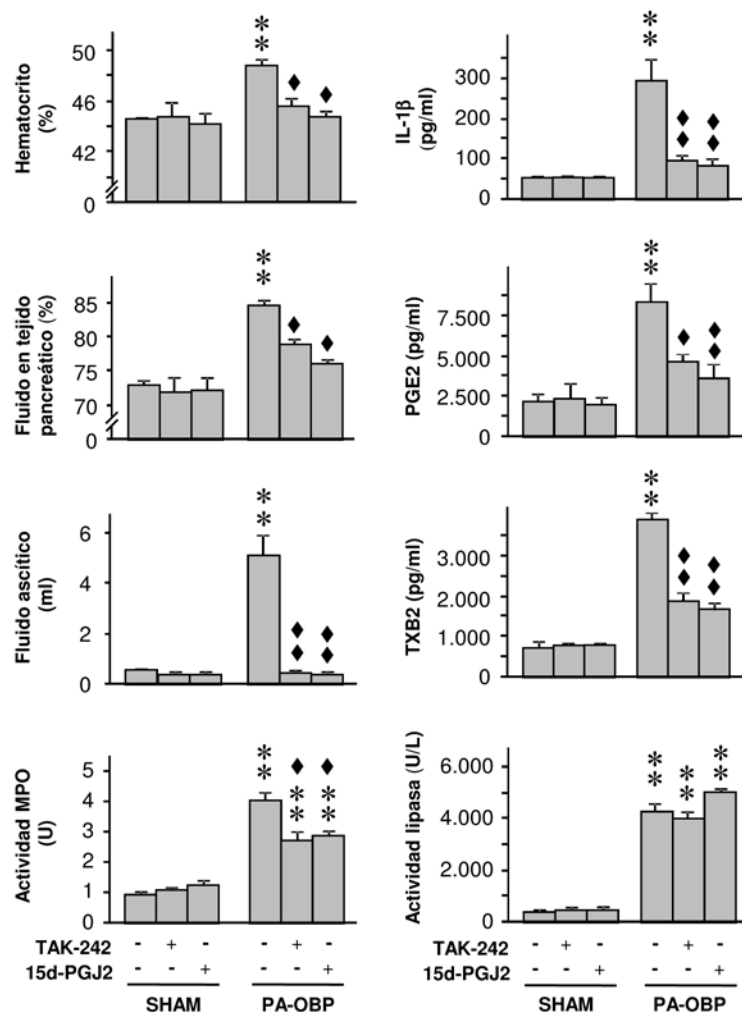


Figura 49. Hematocrito, porcentaje de fluido pancreático, volumen de fluido ascítico, actividad mieloperoxidasa (MPO) en páncreas, concentraciones plasmáticas de IL-1 $\beta$ , PGE2 y TXB2 y actividad lipasa en plasma de ratas sin PA (sham) y ratas con pancreatitis aguda inducida por obstrucción biliopancreática (PA-OBP) durante 12 h, tratadas y no tratadas con el inhibidor de TLR4 (TAK-242, 3mg/kg) o con el agonista de PPAR $\gamma$  (15d-PGJ2, 1 mg/kg). Los valores representan medias  $\pm$  SEM. N=5. El análisis estadístico ANOVA seguido del test de Tukey reveló diferencias significativas respecto al grupo SHAM (\*\*  $p < 0,01$ ) y respecto a ratas con PA-OBP (◆  $p < 0,05$ , ◆◆  $p < 0,01$ ).



## V. DISCUSIÓN





## 1. SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ACINAR AL EXTRACTO LIPÍDICO DE TEJIDO ADIPOSO Y A LA FRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y SUS CLORHIDRINAS

La necrosis grasa es una característica común en PA humana y experimental (Porter y Banks, 1991, Schmitz-Moormann, 1981), desencadenada por la acción enzimática de las enzimas lipasa y fosfolipasa, liberadas de forma anómala a través la membrana basolateral de las células acinares pancreáticas desde estadios tempranos de la enfermedad. Diferentes tipos de compuestos generados en tejido adiposo necrótico podrían ser responsables de desarrollar formas más graves de PA, una hipótesis que reforzaría la relación bien establecida entre la obesidad y una PA de mayor gravedad (Navina *et al.*, 2011, Pereda *et al.*, 2012).

En nuestro estudio, se ha recogido el tejido adiposo de ratas con PA necrotizante, habiendo elegido la infusión retrógrada por el conducto biliopancreático de taurocolato sódico (5 %, 6 h) como modelo experimental, que cursa con necrosis tanto del tejido pancreático como del tejido adiposo peripancreático. Se extrajeron las muestras de las áreas no necróticas y necróticas del tejido adiposo por considerar interesante conocer las alteraciones en la composición lipídica de los focos necróticos, los cuales podrían estar relacionados con una potencial respuesta inflamatoria en células acinares.

Nuestros resultados mostraron que las células acinares pancreáticas, una fuente importante de mediadores inflamatorios en el curso de PA (Ramudo *et al.*, 2005a), representan una diana para los derivados lipídicos generados en la necrosis grasa peripancreática. Observamos que, a una concentración subletal, los extractos lipídicos obtenidos de tejido adiposo necrótico produjeron un aumento en la expresión de CCL2 y P-selectina en acinos pancreáticos. Sin embargo, el extracto lipídico de las áreas no necróticas de tejido adiposo de ratas con PA no indujo respuesta inflamatoria acinar, indicando que los eventos que ocurren como consecuencia de la necrosis grasa son los responsables de la respuesta inflamatoria observada. Nuestros resultados sugieren que, al inducir la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión en células acinares, los compuestos lipídicos procedentes de grasa necrótica podrían contribuir a potenciar el reclutamiento de leucocitos circulantes hacia la glándula, exacerbando así la gravedad de la PA. Un aumento en la expresión acinar de otros mediadores inflamatorios clave en la respuesta inflamatoria (TNF $\alpha$ , IL-6, CXCL1) podría esperarse, ya que se ha descrito un patrón paralelo en la expresión

de diferentes mediadores en otras situaciones inflamatorias (Blinman *et al.*, 2000, Navina *et al.*, 2011, Ramudo *et al.*, 2005a, Yubero *et al.*, 2009a). Igual que estudios previos llevados a cabo en respuesta a lípidos (Gupta *et al.*, 2012, Solinas *et al.*, 2006), la ruta de las MAPKs se activó en acinos pancreáticos, probablemente debido al estrés oxidativo descrito en ratas obesas con PA (Pereda *et al.*, 2012). En línea con los resultados de Navina *et al.* (2011), la activación de NF- $\kappa$ B está implicada en la respuesta inflamatoria acinar a extractos lipídicos de grasa necrótica. La respuesta en célula acinar difiere de la obtenida en macrófagos THP-1, en los que, por mecanismos independientes de NF- $\kappa$ B, se observó un aumento en la expresión de citocinas en respuesta a lípidos presentes en fluido ascítico de ratas con PA (Gutierrez *et al.*, 2008), sugiriendo mecanismos de señalización dependientes del tipo celular.

STAT3 también resultó ser una ruta de señalización subyacente en la respuesta inflamatoria acinar inducida por el extracto lipídico procedente de la necrosis grasa. La participación de la ruta STAT3 se describió previamente en la expresión de citocinas y quimiocinas en células acinares aisladas de páncreas de ratas con PA (Gutierrez *et al.*, 2008, Ramudo *et al.*, 2009, Yubero *et al.*, 2009b) y en células acinares de animales control expuestas a fluido ascítico de ratas con PA (Ramudo *et al.*, 2009), sugiriendo que este factor de transcripción forma parte del mecanismo regulador de la respuesta inflamatoria en células acinares.

Dada la diferente composición lipídica del tejido adiposo de ratas control y de ratas con PA, es interesante investigar la capacidad proinflamatoria de los diferentes compuestos en células acinares pancreáticas. Como era predecible, en comparación con el tejido graso de ratas control, se observó, en tejido adiposo necrótico, una significativa abundancia de AGs generados por la acción lipolítica de enzimas pancreáticas sobre TGs. Asimismo, se observó un aumento de FLs, que en su mayor parte, deben proceder de membranas celulares como consecuencia de la necrosis. Aunque el análisis de la composición de AGs entre las áreas no necróticas y necróticas de tejido adiposo de ratas con PA no reveló diferencias significativas, solo debemos considerar las acciones de los AGs del tejido adiposo necrótico, puesto que es el único origen donde quedan libres para actuar sobre la célula acinar.

De acuerdo con estudios previos (Franco-Pons *et al.*, 2013), nuestros resultados mostraron un elevado reclutamiento de neutrófilos en el tejido adiposo

peripancreático 6 h después de inducir PA, resultando significativamente mayor en las áreas necróticas. Como resultado, se formaron clorhidrinas de ácidos grasos por la acción de la enzima MPO, la cual genera HOCl, que reacciona con AGs insaturados. Las clorhidrinas del ácido linoleico fueron las más abundantes; la forma mono- en las áreas no necróticas y la bisclorhidrina en las áreas necróticas, dada la mayor actividad MPO en éstas últimas. A pesar de que cuanto más insaturado sea el AG, más susceptible de cloración es, no se detectaron clorhidrinas de ácido araquidónico, probablemente debido a la fragilidad descrita para este AG en las reacciones de cloración (Arnhold *et al.*, 2002).

Hay numerosos estudios que involucran a los AGs en la patogénesis y progresión de PA, pero su papel no se conoce con claridad. Se han descrito efectos citotóxicos de los AGs atribuidos a diferentes efectos: inducción de peroxidación lipídica de membranas celulares (Morita *et al.*, 1998), inhibición de la actividad mitocondrial (Navina *et al.*, 2011, Toborek *et al.*, 1996), incremento del calcio intracelular (Toborek *et al.*, 1996), o actuar como detergentes de membranas celulares (Lee y Howard, 1979). También, las clorhidrinas de AGs han demostrado ser citotóxicas por alterar la bicapa lipídica de la membrana celular debido a su mayor polaridad (Carr *et al.*, 1997), o por reducir los niveles celulares de ATP (Dever *et al.*, 2006).

Nosotros hemos investigado la capacidad de AGs y sus clorhidrinas para inducir una respuesta inflamatoria en células acinares pancreáticas. Para obtener una muestra homogénea, la fracción de AGs se obtuvo de tejido adiposo de ratas control y, a partir de ella, se obtuvieron químicamente muestras cloradas prácticamente en su totalidad. Estudios llevado a cabo por Franco-Pons *et al.* (2013), mostraron concentraciones de clorhidrinas de AGs en torno a 250  $\mu\text{M}$  en el fluido ascítico de ratas con PA inducida por NaTc. En base a ello, elegimos la concentración de 300  $\mu\text{M}$  en nuestro estudio, tanto para AGs como para clorhidrinas de los mismos, a fin de establecer un estudio comparativo y determinar los potenciales efectos específicos del proceso de cloración, ya que ambos tipos de compuestos coexisten en el entorno durante la PA.

Nuestros resultados evidenciaron que la fracción de AGs aumentó significativamente la expresión del ARNm de CCL2 y P-selectina en acinos pancreáticos. Sin embargo, las clorhidrinas de AGs no variaron la respuesta

inflamatoria acinar inducida por ácidos grasos sin modificar. Nuestros resultados difieren de los descritos por Franco-Pons y cols. (2013), quienes observaron una mayor expresión de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en macrófagos en respuesta a clorhidrinas de AGs, sugiriendo así una sensibilidad a AGs halogenados dependiente del tipo celular. De acuerdo con nuestros resultados, la generación de clorhidrinas de AGs inducida como resultado de la infiltración masiva de neutrófilos en la grasa necrótica, no incrementaría la respuesta inflamatoria disparada por las células acinares durante PA. Para confirmar esta hipótesis, realizamos cultivos de acinos pancreáticos obtenidos de ratas con PA inducida por OBP durante 3 h, un modelo experimental que induce PA de tipo edematoso, reproduciendo la PA clínica más frecuente, y con el que nuestro grupo de investigación tiene una dilatada experiencia (De Dios *et al.*, 2002, De Dios *et al.*, 2006, Ramudo *et al.*, 2005a). Los resultados obtenidos mostraron que, la exposición de los acinos, tanto a la fracción de AGs como a la de clorhidrinas de AGs, potenció la expresión de CCL2 inducida por la propia PA. Sin embargo, tampoco en esta situación se observó ninguna diferencia en la respuesta a clorhidrinas de AGs en comparación con AGs no modificados.

Los efectos inflamatorios observados en respuesta a AGs, junto con el hecho de un elevado contenido de los mismos en grasa necrótica, sugiere que los AGs puedan ser los principales responsables de exacerbar la respuesta inflamatoria durante PA.

Nuestros resultados apoyan la idea de que la inhibición farmacológica de la lipólisis sea considerada una estrategia terapéutica apropiada para limitar la respuesta inflamatoria local y sistémica en PA, y explicaría los efectos beneficiosos obtenidos tras la administración de inhibidores de lipasa, como Orlistat, en el tratamiento de esta patología (Gea-Sorli *et al.*, 2012, Navina *et al.*, 2011, Noel *et al.*, 2014). Orlistat es un compuesto lipofílico que, además de interferir la absorción de lípidos (Ackroff y Sclafani, 1996), se une covalentemente a residuos de serina presentes en el sitio activo de la lipasa, inhibiendo así su acción enzimática. Inhibe la lipasa pancreática, lipasa gástrica y carboxil-éster lipasa, pero no la PLA2 (Borgstrom, 1988, Gargouri *et al.*, 1991, Krebs *et al.*, 2000). Por tanto, aunque no desde TGs, los AGs podrían seguir liberándose desde FLs, y explicaría que, por mantener cierto grado de respuesta inflamatoria, la gravedad de la PA se reduce, pero la respuesta inflamatoria local no se inhibe totalmente (Gea-Sorli *et al.*, 2012).

Los efectos pro y antiinflamatorios de los AGs, parecen depender de su estructura química y del tipo celular sobre el que actúan (Volpe y Nogueira-Machado, 2013). En base a esto, las diferencias encontradas en la composición de AG entre el tejido adiposo de ratas control y ratas con PA también deben tenerse en consideración.

Estudios previos han concluido que los AGs saturados potencian la respuesta inflamatoria en algunos tipos celulares. Concretamente, el ácido palmítico ha resultado proinflamatorio en astrocitos (Gupta *et al.*, 2012) y macrófagos (Laine *et al.*, 2007, Valdearcos *et al.*, 2012). En base a estos estudios, planteamos la hipótesis de que el elevado contenido en este AG hallado en grasa necrótica podría estar modulando la respuesta inflamatoria acinar. Además, se han descrito efectos proinflamatorios para AGs poliinsaturados (Khan *et al.*, 2014, Noel *et al.*, 2014, Toborek *et al.*, 2002) y efectos antiinflamatorios para los monoinsaturados (Magdalon *et al.*, 2012). De acuerdo con ello, nos planteamos la posibilidad de que el elevado ratio entre AGs poli- y monoinsaturados observado en tejido adiposo necrótico podría ser en parte la causa de la respuesta inflamatoria acinar.

Como resumen de este apartado, sugerimos que los lípidos generados en las áreas necróticas del tejido adiposo durante PA, inducen la respuesta inflamatoria en células acinares. Mientras que los AGs aumentan la expresión de mediadores inflamatorios en acinos pancreáticos, ninguna respuesta adicional es llevada a cabo por sus derivados halogenados, generados como resultado de una infiltración masiva de neutrófilos en la grasa necrótica. Considerando, además, que en la necrosis grasa durante PA aumenta su abundancia de forma significativa, los AGs podrían ser los principales responsables de desencadenar la respuesta inflamatoria en células acinares, desde estadios iniciales de la enfermedad. No se puede descartar que otros aspectos, tales como cambios en la composición relativa de diferentes tipos de ácidos grasos y el incremento en el contenido de FLs, también contribuyan en este proceso. Para clarificar estos aspectos, se llevaron a cabo estudios con AGs individuales, eligiendo aquellos mayoritarios de tipo saturado e insaturado, y con el fosfolípido más representado en tejido graso.

## 2. SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ACINAR A ÁCIDOS GRASOS INDIVIDUALES Y A CLORHIDRINAS DE ÁCIDOS GRASOS

Está generalmente aceptado el papel modulador de los AGs en la inflamación. Sin embargo, no están claramente establecidos los mecanismos involucrados. La valoración de sus efectos en células acinares, aportaría una información relevante en los mecanismos fisiopatológicos de la PA, un objetivo que cobra especial interés en el contexto de la obesidad, dado que aumenta la masa adipocitaria intra y peripancreática (Navina *et al.*, 2011) y, en consecuencia, la cantidad de AGs liberados durante la enfermedad. Además, individuos obesos desarrollan formas graves de la enfermedad con abundante necrosis pancreática y peripancreática (Noel *et al.*, 2014, Segersvard *et al.*, 2001, Sempere *et al.*, 2008), en la que se ha constatado gran abundancia de AGs insaturados (Noel *et al.*, 2014), los cuales son susceptibles de ser clorados por la acción enzimática de MPO procedente de los leucocitos infiltrados.

Efectos pro y antiinflamatorios se han descrito para AGs, variando en función de la estructura molecular del AG y/o la célula sobre la que actúan (Gupta *et al.*, 2012, Navina *et al.*, 2011, Toborek *et al.*, 2002). Por tanto, es de gran interés profundizar en el conocimiento de las acciones individuales que los AGs mayoritarios encontrados en el tejido graso tienen sobre las células acinares, fuente inicial de mediadores inflamatorios durante la PA (Ramudo *et al.*, 2005a), ya que la acción específica de cada uno de ellos podría determinar la evolución de esta enfermedad. El uso de AGs saturados (palmítico, esteárico) con diferente número de átomos de carbono y, de AGs insaturados (oleico, linoleico) con cadenas hidrocarbonadas de igual longitud, pero con diferente número de dobles enlaces, nos permitió determinar el efecto observado en la célula acinar depende de la estructura química de los AGs y, en ese caso, dilucidar cuál es el aspecto molecular clave.

Estudios previos han demostrado una respuesta proinflamatoria a AGs saturados, mediada por TLR4, en astrocitos (Gupta *et al.*, 2012), macrófagos (Lee *et al.*, 2001), células dendríticas (Weatherill *et al.*, 2005) y adipocitos (Yeop Han *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de ácido palmítico y esteárico en nuestro estudio, reveló que ninguno de los dos AGs saturados fue capaz de disparar la respuesta inflamatoria en la célula acinar. Tampoco variaron su viabilidad, incluso a dosis cuatro veces más altas de las que resultaron letales para los AGs insaturados.

Por el contrario, los AGs insaturados oleico y linoleico aumentaron, en un grado similar, la expresión de ARNm de CCL2. El estudio detenido de los mecanismos de señalización involucrados reveló que, previa a la expresión de TLR4, ácido oleico y ácido linoleico desencadenan la activación de JNK-, ERK- y p38-MAPKs, así como JAK en la célula acinar.

Está ampliamente aceptado que la fosforilación requerida para la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B es dependiente de MAPKs, mientras que la activación del factor de transcripción STAT3 está asociada, generalmente, a la fosforilación de JAK (Heinrich *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2013). Sin embargo, el uso de inhibidores específicos para cada cinasa indicó que, tanto MAPKs como JAK, están implicadas en la activación acinar de los dos factores de transcripción, NF- $\kappa$ B y STAT3, mediada por AGs insaturados. La inhibición individual de cada una de estas cinasas no reprimió totalmente la sobreexpresión de CCL2, inducida tanto por el ácido oleico como por el ácido linoleico, lo que indica que JNK-, p38- y ERK-MAPK y JAK actúan de forma sinérgica sobre los mecanismos que convergen en la expresión de CCL2. Además, la inhibición selectiva de la activación de NF- $\kappa$ B y STAT3 aportó evidencias de que ambos factores de transcripción son requeridos para la regulación del aumento de la expresión de ARNm de CCL2 en células acinares estimuladas con ácido oleico o linoleico. En línea con nuestros resultados, la participación de NF- $\kappa$ B en la expresión de genes proinflamatorios inducida por AGs ha sido descrita en otras células, como adipocitos (Siriwardhana *et al.*, 2012) y células endoteliales (Hennig *et al.*, 2006, Hennig *et al.*, 1996, Toborek *et al.*, 2002). Sin embargo, en células dendríticas (Zeyda *et al.*, 2005) se ha demostrado que la modulación génica inducida por AGs insaturados ocurre por mecanismos independientes de NF- $\kappa$ B.

En cuanto a la señalización por STAT3, los resultados obtenidos con ácido oleico y ácido linoleico refuerzan la idea de que esta ruta participa en la respuesta inflamatoria acinar a componentes lipídicos de tejido adiposo necrótico de ratas con PA grave. Estudios previos demostraron que la activación de STAT3 está involucrada en la respuesta inflamatoria acinar durante PA (Yubero *et al.*, 2009a, b). Todos estos resultados indican que, además de NF- $\kappa$ B y AP-1 (Orlichenko *et al.*, 2010, Ramudo *et al.*, 2005a, Ramudo *et al.*, 2009), la actividad transcripcional de STAT3 podría ser crucial en los mecanismos de señalización inductores de la expresión de mediadores inflamatorios en células acinares expuestas a condiciones de estrés.

También analizamos la respuesta inflamatoria acinar a clorhidrinas individuales de ácido oleico y ácido linoleico, para descartar que la falta de respuesta a la cloración observada con clorhidrinas de la fracción de AGs totales sea debida a respuestas individuales opuestas que queden enmascaradas en la respuesta al conjunto de clorhidrinas de AGs. Tanto la expresión de CCL2 como la activación de las rutas de señalización resultaron similares a las observadas en respuesta a sus correspondientes AGs sin clorar. Los resultados obtenidos, de nuevo refuerzan la hipótesis de que la cloración no modifica la actividad citotóxica ni inflamatoria del AG no modificado, y permite concluir que es la propia molécula de AG la que desencadena la cascada de eventos inflamatorios observados, mientras que la inserción de átomos de cloro en su estructura química no ejerce efectos adicionales.

Los receptores PPARs son una familia de factores de transcripción inducibles por ligando involucrados en la respuesta inflamatoria asociada a lípidos (Volpe y Nogueira-Machado, 2013). PPAR $\gamma$  se ha visto altamente expresado en células pancreáticas AR42J (Masamune *et al.*, 2002) y en tejido pancreático (Xu *et al.*, 2013). Al actuar como ligandos de PPAR $\gamma$ , los AGs insaturados n3 han mostrado ejercer efectos supresores en la respuesta inflamatoria (Schmitz y Ecker, 2008). Por el contrario, los efectos proinflamatorios inducidos por lípidos en macrófagos resultaron ser consecuencia de la interferencia con la actividad antiinflamatoria de PPAR $\gamma$  (Gutierrez *et al.*, 2008). La activación de la ruta PPAR $\gamma$  mediante la adición de 15d-PGJ2, en presencia de ácido oleico o linoleico, resultó en la inhibición total de la expresión de CCL2 mediada por estos AGs. El uso de 15d-PGJ2, el agonista más específico de PPAR $\gamma$  (Forman *et al.*, 1995), nos permitió elucidar los mecanismos de señalización disparados por la ruta PPAR $\gamma$  para inhibir la expresión de CCL2 inducida por AGs insaturados en acinos pancreáticos. Nuestros resultados mostraron que la activación de PPAR $\gamma$  previno la fosforilación de MAPKs y JAK y de esta forma, la consiguiente activación de NF- $\kappa$ B y STAT3. En línea con nuestros resultados, se ha descrito un bloqueo de la activación de NF- $\kappa$ B (Forman *et al.*, 1995) y STAT3 (Yu *et al.*, 2008) en células pancreáticas AR42J pretratadas con 15d-PGJ2. Nuestros resultados refuerzan la noción de que agonistas de PPAR $\gamma$  podrían ser considerados como una potencial estrategia terapéutica para reducir la inflamación durante PA (Ding *et al.*, 2013, Folch-Puy *et al.*, 2006b, Hashimoto *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2011).



De acuerdo con nuestros resultados, el aumento de expresión de CCL2 en respuesta a ácido linoleico ha sido descrita en diferentes tipos celulares (Jiang *et al.*, 1999, Nguyen *et al.*, 2012, Toborek *et al.*, 2002), incluyendo células acinares (Navina *et al.*, 2011). Sin embargo, para el ácido oleico se han descrito efectos proinflamatorios (Fang *et al.*, 2009), antiinflamatorios (Toborek *et al.*, 2002), así como ausencia de efectos (Gupta *et al.*, 2012). La acción proinflamatoria observada en nuestro estudio podría explicar, en parte, la etiopatogenia de la PA experimental inducida en ratas por la infusión retrógrada de ácido oleico en el conducto pancreático (Tashiro *et al.*, 2003, Yamaguchi *et al.*, 2002), ya que el aumento en la expresión de CCL2 inducido por ácido oleico en células acinares podría actuar como señal para la atracción de leucocitos circulantes hacia la glándula y desencadenar formas más graves de PA.

Hawkins *et al.* (1998) demostraron que la peroxidación lipídica y muerte de células acinares pancreáticas en respuesta a AGs está relacionada con el número de dobles enlaces en la molécula. Este hallazgo nos llevó a plantear la hipótesis de que el incremento del ratio AGs poli-/monoinsaturados encontrado en tejido adiposo necrótico de ratas con PA grave podría ser la causa de la respuesta inflamatoria acinar observada en nuestro estudio en presencia de la fracción de AGs totales. Los resultados obtenidos con ácido oleico y ácido linoleico nos hacen descartar esta hipótesis, puesto que, tanto el efecto citotóxico como la respuesta inflamatoria, resultaron similares para ambos AGs cuando se ensayaron a la misma concentración.

Considerando conjuntamente la respuesta a AGs saturados e insaturados y, en línea con estudios previos (Cridde *et al.*, 2006, Mossner *et al.*, 1992, Navina *et al.*, 2011), nuestros datos corroboran la idea de que el estado de insaturación de AGs determina el daño y la respuesta inflamatoria en células acinares pancreáticas. Nuestros resultados aportan evidencias de que es la presencia de dobles enlaces en la molécula del AG, pero no el número de los mismos ni la longitud de la cadena, la característica estructural clave que determina la activación de los mecanismos necesarios para el desarrollo de la respuesta inflamatoria en células acinares pancreáticas.

Los resultados de este apartado aportan información novedosa acerca de los mecanismos moleculares por los cuales AGs ejercen efectos diferenciales en la respuesta inflamatoria disparada en células acinares pancreáticas dependiendo del estado de insaturación. Nuestro estudio describe los mecanismos a través de los

cuales los AGs insaturados, pero no los AGs saturados, más abundantes en grasa peripancreática, y que son liberados durante PA, podrían jugar un papel en la fisiopatología de la enfermedad.

### 3. SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ACINAR A ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

Aunque no es el AG más abundante, el ácido araquidónico es el siguiente AG insaturado más representado en focos necróticos de tejido adiposo de ratas con PA después del ácido oleico y linoleico. Por esta razón, y porque, a pesar de las controversias acerca de los efectos de distintos AGs en la inflamación, están ampliamente aceptados los efectos proinflamatorios del ácido araquidónico (Khan *et al.*, 2014, Nguyen *et al.*, 2012), decidimos valorar su papel en la respuesta inflamatoria acinar. Nuestros resultados también indicaron que, a concentraciones subletales, y dentro del rango encontrado en plasma de pacientes con PA (Sztefko y Panek, 2001), el ácido araquidónico ejerce efectos proinflamatorios en células acinares pancreáticas.

En nuestro estudio, se han analizado de forma independiente los resultados obtenidos con el ácido araquidónico, debido a que en la bibliografía, su acción proinflamatoria se ha asociado, generalmente, con los productos derivados de su metabolismo, los eicosanoides (Kawahara *et al.*, 2014, Sun *et al.*, 2007). Sin embargo, no se conocen con profundidad los mecanismos moleculares implicados en la acción del ácido araquidónico.

El uso de Celecoxib nos ha permitido conocer que la expresión de CCL2 y P-selectina inducida por ácido araquidónico, está mediada por una elevada generación de productos derivados de la acción de la enzima COX-2 (PGE2 y TXB2).

TLR4 y PPAR $\gamma$  desencadenan efectos opuestos en los mecanismos moleculares asociados a respuestas inflamatorias (Bensinger y Tontonoz, 2008, Volpe y Nogueira-Machado, 2013). Los receptores TLR han sido tradicionalmente considerados como los sensores que median la inflamación inducida por infección a través del reconocimiento de patógenos, activando rutas de señalización subyacentes que dan lugar a la inducción de la expresión de genes inflamatorios (Akira y Takeda, 2004). Por el contrario, la activación de PPAR $\gamma$  juega un papel protector en las respuestas inflamatorias (Delerive *et al.*, 1999, Ding *et al.*, 2013). TLR4 es reconocido

como el receptor de LPS (Poltorak *et al.*, 1998), pero hay cada vez más evidencias que apoyan la hipótesis de que AGs también podrían actuar como ligandos endógenos de TLR4. Actualmente, solo hay referencias bibliográficas que describen, en diferentes tipos celulares, la activación de rutas inflamatorias mediadas por TLR4 en respuesta a AGs saturados (Gupta *et al.*, 2012, Lee *et al.*, 2001, Weatherill *et al.*, 2005, Yeop Han *et al.*, 2010). Nuestro estudio evalúa, por primera vez, si TLR4 actúa como vínculo entre AGs y la respuesta inflamatoria acinar.

Se ha demostrado la presencia de TLR4 en células acinares aisladas de páncreas de ratas tratadas con LPS (Bonior *et al.*, 2012) y en páncreas de ratas con PA (Li *et al.*, 2005, Sawa *et al.*, 2007). A pesar de que la relación entre un aumento de expresión de TLR4 y la inflamación está bien aceptada, los mecanismos moleculares involucrados no están bien elucidados. Resultados obtenidos en ratones TLR4-deficientes demostraron que TLR4 está involucrado en la fisiopatología de PA (Sawa *et al.*, 2007, Sharif *et al.*, 2009). De acuerdo con estos estudios, LPS sería la señal que inicia la inflamación mediada por TLR4 en fases avanzadas de la PA, cuando se produce la translocación de bacterias a través de la barrera intestinal. Sin embargo, Sharif *et al.* (2009) observaron activación de TLR4 en PA en ausencia de LPS, la situación habitual en fases iniciales de la enfermedad. Para explicar la participación de TLR4 en estadios tempranos de PA, es crucial investigar el papel de TLR4 en la respuesta inflamatoria desencadenada inicialmente en las células acinares pancreáticas en respuesta a agonistas endógenos, como ácido araquidónico, cuya generación estaría aumentada como resultado de la acción lipolítica sobre TGs y FLs de membrana.

TAK-242, un inhibidor farmacológico específico de la ruta TLR4, ha sido utilizado en nuestro estudio para determinar si el aumento de expresión de TLR4 observado en células acinares expuestas a AA está asociado a la activación del resto de mecanismos moleculares que desencadenan la respuesta inflamatoria acinar y, en ese caso, averiguar el papel específico de TLR4. TAK-242 redujo significativamente la generación de metabolitos de ácido araquidónico mediada por COX-2 y reprimió la expresión de genes inflamatorios en células acinares expuestas a este AG. En la misma línea que los resultados obtenidos en estudios previos llevados a cabo en macrófagos estimulados con AGs saturados (Lee *et al.*, 2001) o LPS (Sha *et al.*, 2007), como ligandos de TLR4, nuestros datos indicaron que la activación de COX-2

es un mecanismo involucrado en la respuesta inflamatoria acinar a ácido araquidónico activado por la ruta TLR4.

Además, el uso de TAK-242 reveló la implicación de la ruta TLR4 en la activación de la cascada de señalización inflamatoria mediada por la activación de cinasas y de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3, los cuales, a través de la generación de PGE2 y TXB2, actúan como inductores de la expresión acinar de genes inflamatorios. La inhibición selectiva de estas señales, reveló una mayor contribución de la cinasa ERK y del factor NF- $\kappa$ B en la generación de metabolitos del ácido araquidónico, responsables finales del aumento de expresión acinar de genes inflamatorios en respuesta a ácido araquidónico. Interacción entre TLR4 y NF- $\kappa$ B asociada con la elevada expresión de CCL2 se ha demostrado también en macrófagos en respuesta a LPS (Lee *et al.*, 2001).

Por otra parte, el uso de TAK-242 nos permitió comprobar que la reducción en la expresión de PPAR $\gamma$  inducida por ácido araquidónico, también es dependiente de la activación de TLR4, una interrelación descrita previamente en adipocitos (Nguyen *et al.*, 2012).

La consideración conjunta de estos resultados indican que TLR4 juega un papel clave en la respuesta inflamatoria de acinos pancreáticos a ácido araquidónico mediante dos efectos complementarios: la síntesis de productos derivados de la acción de la COX-2, capaces de activar rutas de señalización proinflamatorias, y la regulación negativa de la expresión de PPAR $\gamma$ , un factor de transcripción inducible por ligando con efectos antiinflamatorios. Sin embargo, el uso de Celecoxib reveló que la expresión de TLR4 en acinos pancreáticos expuestos a ácido araquidónico no está mediada por los eicosanoides derivados de su metabolismo.

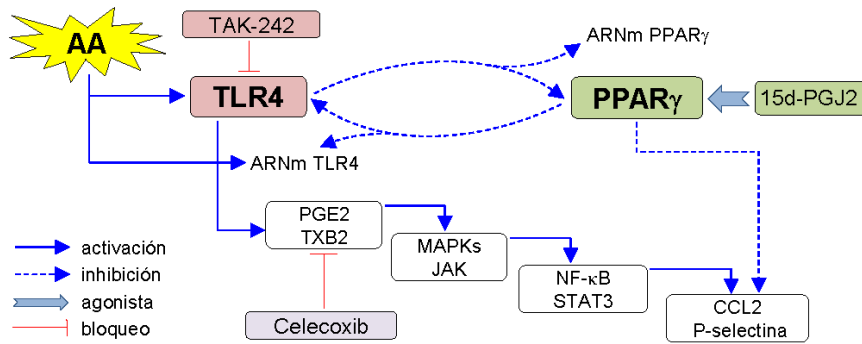
Nuestro estudio sugiere que la presencia de ácido araquidónico juega un papel importante desde estadios tempranos de PA, activando rutas proinflamatorias y reprimiendo otras antiinflamatorias en células acinares pancreáticas, las cuales actúan como fuente inicial de mediadores inflamatorios durante esta patología (Ramudo *et al.*, 2005a).

Por otra parte, el daño observado en la célula acinar expuesta a concentraciones elevadas de ácido araquidónico nos llevó a sugerir que este AG podría estar involucrado en el desarrollo de la necrosis pancreática en fases más

avanzadas de pancreatitis. En contraposición con los mecanismos de la respuesta inflamatoria, los efectos citotóxicos demuestran no estar mediados por eicosanoides, ni tampoco pueden ser atribuidos a la activación de TLR4, ya que no se previnieron con Celecoxib o TAK-242. Estos resultados refuerzan la idea de que el ácido araquidónico ejerce efectos directos en las propiedades físico-químicas de la membrana de células acinares, que llevaría a una pérdida de su integridad, debido a la peroxidación lipídica promovida por ácido araquidónico (Finstad *et al.*, 1994, Shiose y Sumimoto, 2000).

La activación de PPAR $\gamma$  con 15d-PGJ2, a través de una inhibición de TLR4, redujo la generación de eicosanoides derivados del ácido araquidónico y, como resultado, previno la expresión de CCL2 y P-selectina en acinos pancreáticos. En línea con estudios previos (Ricote *et al.*, 1998, Yano *et al.*, 2007), nuestros resultados demostraron que el agonista de PPAR $\gamma$  ejerció un efecto antiinflamatorio por interferir en la activación de MAPKs y antagonizar las rutas NF- $\kappa$ B y JAK/STAT3. Todos estos resultados apoyan el efecto protector de PPAR $\gamma$  en PA (Ding *et al.*, 2013, Folch-Puy *et al.*, 2006b, Xu *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en experimentos *in vitro* sugieren que la inhibición de la ruta TLR4 o la activación de la ruta PPAR $\gamma$  podrían ser beneficiosas en el tratamiento de PA. Esta hipótesis está reforzada por los datos resultantes de estudios *in vivo* llevados a cabo en ratas con PA inducida por OBP durante 12 h, al comprobar que, tanto el tratamiento con TAK-242, como con 15d-PGJ2, aunque no previnieron la hiperamilasemia, redujeron significativamente el hematocrito y varios indicadores de la inflamación, incluidos los niveles plasmáticos de PGE2 y TXB2. De acuerdo con estudios previos llevados a cabo en otros modelos experimentales de PA (Ding *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2005, Sawa *et al.*, 2007, Xu *et al.*, 2011), nuestros resultados permiten concluir que TLR4 juega un papel clave en PA y respalda el uso de inhibidores de TLR4, así como de agonistas de PPAR $\gamma$ , como potenciales estrategias terapéuticas para mitigar la respuesta inflamatoria en la PA.



**Resumen esquemático de la respuesta inflamatoria acinar a ácido araquidónico (AA).**

La acción inflamatoria y citotóxica observada con AGs insaturados mayoritarios respaldan el trabajo llevado a cabo por Noel *et al.* (2014), quienes demostraron que los AGs insaturados, encontrados en elevadas concentraciones en las colecciones necróticas de individuos obesos con PA, son responsables no solo de la necrosis acinar, sino también del fallo multiorgánico, por mecanismos independientes de la necrosis pancreática. También refuerzan la idea de que una elevada generación de AGs durante PA agrava la enfermedad (Navina *et al.*, 2011), un hecho que cobra especial interés en situaciones de obesidad, una patología considerada factor de riesgo para el desarrollo y peor pronóstico de PA (Martinez *et al.*, 2006, Pereda *et al.*, 2012).

**4. SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ACINAR AL FOSFOLÍPIDO**

**1-PALMITOIL-2-OLEOIL-SN-GLICERO-3-FOSFOCOLINA (POPC)**

Los FLs son otros compuestos lipídicos que, en las formas más graves de PA, se estarían liberando al espacio intersticial pancreático como resultado de la rotura de membranas de células del páncreas y tejido adiposo circundante. Nuestros resultados muestran un incremento en la proporción de FLs en las áreas necróticas del tejido adiposo peripancreático de ratas con PA necrotizante, y otros autores han demostrado también su presencia en el fluido ascítico (Gutierrez *et al.*, 2008).

Los FLs son susceptibles de sufrir procesos de oxidación, habiéndose encontrado acumulados en los sitios de inflamación (Berliner *et al.*, 2001, Gharavi *et al.*, 2007, Subbanagounder *et al.*, 2000). La modificación química de los FLs da lugar

a una gran variedad de productos con efectos moduladores sobre los mecanismos de transducción y la expresión de genes inflamatorios. Efectos proinflamatorios (Reddy *et al.*, 2001) y antiinflamatorios (Erridge *et al.*, 2008) en respuesta a FLs se han descrito en diferentes tipos celulares.

Los FLs oxidados son una familia emergente de mediadores inflamatorios, cuyos efectos sobre la modulación de genes inflamatorios se han descrito hace poco más de una década (Reddy *et al.*, 2002, Van Lenten *et al.*, 2001). La mayoría de los estudios han centrado su atención hacia el papel que puedan jugar en aterosclerosis o enfermedades pulmonares. Sin embargo, no existe una amplia información en otras patologías en las que las células estén expuestas a un intenso estrés oxidativo capaz de generar EROs que favorezcan la generación de FLs oxidados. PAPC es el FL más referenciado en la bibliografía. Estudios en ratas con PA necrotizante (Li *et al.*, 2007) han mostrado que la administración de PAPC oxidado reduce el daño pancreático. Sin embargo, no hay estudios que valoren los efectos que los FLs podrían ejercer sobre las células acinares pancreáticas.

En base a nuestros resultados, el efecto de POPC en acinos es dependiente de la concentración y el estado de oxidación. Solo a bajas concentraciones y en su forma oxidada, POPC demostró ejercer un efecto proinflamatorio sobre acinos pancreáticos, incrementando la expresión de CCL2 mediada por TLR4.

Debido a su similitud estructural con LPS, estudios anteriores con otros FLs han descrito también activación de la respuesta inflamatoria a través de TLR4. Así, se ha demostrado que PAPC oxidado incrementa la expresión de IL-8 y otras citocinas por mecanismos dependientes de TLR4 en células endoteliales (Walton *et al.*, 2003) y macrófagos (Imai *et al.*, 2008). En línea con nuestros resultados, la inhibición de TLR4 también reprimió, en HUVEC, la producción de mediadores inflamatorios en respuesta a FLs (Li *et al.*, 2013). Asimismo, ratones mutantes en TLR4 han mostrado mayor resistencia al daño pulmonar inducido por PAPC oxidado (Imai *et al.*, 2008). La expresión génica de CCL2 asociada a un aumento de expresión de TLR4 también fue observada en nuestro estudio en respuesta a AGs insaturados, y todo parece indicar que la activación de TLR4 tiene un papel clave para iniciar la respuesta inflamatoria a lípidos en la célula acinar.

Estudios previos han demostrado aumentos en la expresión de P-selectina, ICAM-1 e IL-8 en células endoteliales expuestas a FLs modificados químicamente

con el mismo grupo polar, pero diferente composición de AGs (SOPC o PAPC) (Dever *et al.*, 2008, Reddy *et al.*, 2001, Van Lenten *et al.*, 2001). Además, en células HUVEC también se ha descrito un incremento de la expresión de IL-8 en respuesta a diferentes FLs con los mismos AGs, pero diferente grupo polar en su molécula (PAPC, PAPA, PAPG) (Oskolkova *et al.*, 2010). Todo ello sugiere que el efecto proinflamatorio de los FLs depende, no tanto del UFA o grupo polar que presentan en su molécula, sino de la modificación química ocurrida por reacciones de oxidación.

Takeda *et al.* (2003) mostraron que la activación por ligando de TLR4 induce la activación de MAPKs, las cuales han demostrado estar implicadas en la expresión acinar de CCL2 y otros genes inflamatorios en diferentes situaciones experimentales (Blinman *et al.*, 2000, Ramnath y Bhatia, 2006, Yubero *et al.*, 2009a, b). El uso de inhibidores específicos de JNK (representante elegida de MAPKs) y JAK, reveló la participación de ambas cinasas en la expresión acinar de CCL2 en respuesta a POPC oxidado.

La activación de TLR4 también resultó clave para la activación acinar de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3, como mecanismo previo al aumento de expresión de CCL2. Tal como se observó con ácido araquidónico, parece prioritaria la participación de NF- $\kappa$ B en la respuesta inflamatoria de las células acinares a FLs oxidados. No obstante, la contribución de STAT3 en esta respuesta también es significativa, un resultado observado por otros autores en respuesta a PAPC oxidado (Gharavi *et al.*, 2007, Yeh *et al.*, 2004).

El análisis detallado de los resultados obtenidos con el inhibidor de TLR4 indica que, la activación de NF- $\kappa$ B ocurre por mecanismos totalmente dependientes de la ruta TLR4, tal como se ha descrito en la expresión de genes inflamatorios en macrófagos en respuesta a LPS (Rhee y Hwang, 2000). Sin embargo, la activación de STAT3, además de estar mediada por TLR4, ocurre también por mecanismos independientes de este receptor. Apuntamos como potenciales candidatos la generación de gran cantidad de EROs producidas en la célula acinar en presencia de POPC oxidado. Esta hipótesis se basa en el hecho de que la ruta STAT3 ha demostrado activarse intensamente en la célula acinar durante la PA como consecuencia del estrés oxidativo, un efecto revertido con la administración del antioxidante N-acetilcisteína (Yubero *et al.*, 2009b).



Se plantearon experimentos con células acinares preestimuladas NaTc para simular una situación proinflamatoria inducida por PA y poder analizar el papel que POPC tendría sobre la respuesta inflamatoria desencadenada en la célula acinar desde estadios tempranos de una PA grave. Nuestros resultados muestran que POPC oxidado, por potenciar la expresión de la quimiocina CCL2, podría contribuir al reclutamiento de células inflamatorias al tejido pancreático, un proceso patogénico clave en PA (Bhatia *et al.*, 1998, Closa *et al.*, 1994, Ramudo *et al.*, 2007).

Por haberse sugerido que un mismo FL oxidado podría ejercer efectos pro y antiinflamatorios sobre el mismo tipo celular (Oskolkova *et al.*, 2010), nos planteamos la posibilidad de que la falta de efecto observado con POPC y POPC oxidado a la concentración de 50  $\mu$ M en acinos pancreáticos de ratas control, podría deberse a un efecto antiinflamatorio. Esta hipótesis se confirmó al realizar los ensayos sobre células preestimuladas con NaTc, y comprobar una represión de la expresión de CCL2.

Este efecto dual, pro y antiinflamatorio de POPC observado en células acinares, se ha descrito previamente con otros FLs. PAPC oxidado ha demostrado inducir la expresión de genes proinflamatorios en células endoteliales (Oskolkova *et al.*, 2010) e interacción monocito-endotelio (Cole *et al.*, 2003), pero también ejerció un efecto protector en modelos animales, por bloquear la respuesta a LPS (Li *et al.*, 2007, Oskolkova *et al.*, 2010).

Un número creciente de estudios refuerzan la idea de que los FLs oxidados ejercen un papel protector en la inflamación al interferir con la ruta TLR4, y regular negativamente la expresión de factores inflamatorios (Bochkov *et al.*, 2002, Bochkov *et al.*, 2010, Oskolkova *et al.*, 2010). Nuestros resultados mostraron igualmente que la represión de la expresión de CCL2 inducida por POPC y POPC oxidado, se acompaña de una inhibición de la expresión de TLR4 ocurrida en acinos pancreáticos en respuesta a NaTc. En línea con nuestros resultados, FLs oxidados redujeron la expresión de E-selectina, TNF $\alpha$ , VCAM-1, ICAM-1 e IL-6 dependiente de TLR4 en diferentes tipos celulares (Bochkov *et al.*, 2002, von Schlieffen *et al.*, 2009). Sugerimos que los mecanismos antiinflamatorios de POPC y POPC oxidado requieren una regulación negativa de la expresión génica de TLR4.

A pesar de que el efecto inhibitorio de los FLs se ha atribuido al estado de oxidación (von Schlieffen *et al.*, 2009), nuestros resultados en acinos pancreáticos

apoyan conclusiones de otros estudios (Oskolkova *et al.*, 2010), indicando que es la concentración lo que determina la actividad pro o antiinflamatoria de los FLs. Altas dosis de FLs oxidados promueven la función de la barrera endotelial vascular (Fu y Birukov, 2009), ejerciendo así una acción protectora a través de mecanismos de retroalimentación negativos que atenúa las cascadas de señalización inflamatorias.

Se ha justificado la acción antiinflamatoria de FLs por actuar como agonistas y/o ligandos de PPAR $\gamma$  (Davies *et al.*, 2001, Song *et al.*, 2011), cuya activación ha mostrado inhibir respuestas inflamatorias, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Masamune *et al.*, 2002, Schmitz y Ecker, 2008, Xu *et al.*, 2013, Xu *et al.*, 2011). Dada la interacción observada entre TLR4 y PPAR $\gamma$  en la respuesta acinar a AGs insaturados, resultó interesante valorar la posible implicación de este factor de transcripción en la respuesta antiinflamatoria de POPC.

Estudios previos describieron un aumento en la expresión de PPAR $\gamma$  (Davies *et al.*, 2001, Tontonoz *et al.*, 1998), y aunque en nuestro estudio no observamos resultados relevantes en cuanto a la expresión de este gen, sí que pudimos valorar la implicación de PPAR $\gamma$  en la respuesta antiinflamatoria a POPC mediante el uso de GW9662. La inhibición de PPAR $\gamma$  previno la represión de CCL2 ejercida por POPC y POPC oxidado, así como la de TLR4, sugiriendo que los FLs, ejercen su efecto antiinflamatorio en células acinares, al menos en parte, por mecanismos dependientes de PPAR $\gamma$ , cuya activación regula negativamente la expresión de TLR4, limitando así las rutas inflamatorias subyacentes. La interacción entre las rutas TLR4 y PPAR $\gamma$ , que también se puso de manifiesto con AGs, debe ser considerada clave en la modulación de la respuesta inflamatoria a lípidos en la célula acinar.

Nuestros resultados muestran, por primera vez, los mecanismos moleculares involucrados en los efectos pro y antiinflamatorios que POPC ejerce sobre la célula acinar. Dependiendo de la concentración y de su modificación química, POPC, por mecanismos dependientes de TLR4, modula la activación de rutas de señalización subyacentes al receptor, involucradas en la expresión acinar de CCL2. Además, la ruta PPAR $\gamma$  está involucrada en el efecto represor que POPC, a elevada concentración, tiene sobre la expresión de CCL2 en acinos pancreáticos, por reprimir la expresión de TLR4. Los mecanismos de acción de los FLs apoyan también el uso de antagonistas de TLR4, o agonistas de PPAR $\gamma$ , para reducir la respuesta inflamatoria en PA.

## VI. CONCLUSIONES



1. Los ácidos grasos ejercen un efecto diferencial sobre la célula acinar dependiendo de su estructura química, siendo la presencia de dobles enlaces, pero no el número de estos, ni la longitud de la cadena, lo que determina su citotoxicidad y su acción proinflamatoria.
2. Los ácidos grasos insaturados, liberados en altas concentraciones de tejido adiposo necrótico durante la pancreatitis aguda, son los principales lípidos responsables de inducir respuesta inflamatoria en la célula acinar.
3. La presencia de clorhidrinas de ácidos grasos en tejido adiposo necrótico no contribuiría en la respuesta inflamatoria desencadenada en las células acinares durante la pancreatitis aguda.
4. La respuesta inflamatoria inducida en la célula acinar por los ácidos grasos insaturados mayoritarios (ácido oleico y ácido linoleico), liberados de focos necróticos de grasa peripancreática, cursa por mecanismos que incluyen expresión de TLR4 y la activación sinérgica de NF- $\kappa$ B y STAT3, mediada por la actividad conjunta de MAPKs y JAK.
5. A través de TLR4, el ácido araquidónico ejerce un efecto proinflamatorio en la célula acinar por una doble vía: a) generación de eicosanoides, responsables de aumentar la expresión de CCL2 y P-selectina, y b) represión de la expresión de PPAR $\gamma$ , con efectos inhibidores sobre la cascada de señalización inflamatoria activada por eicosanoides, en la que ERK/NF- $\kappa$ B es la ruta prioritaria.
6. POPC, el fosfolípido más representativo liberado de grasa necrótica peripancreática en ratas con pancreatitis aguda, ejerce un efecto dual sobre la respuesta inflamatoria acinar. Únicamente a bajas concentraciones y en su forma oxidada ejerce un efecto proinflamatorio, dependiente prioritariamente de la activación de NF- $\kappa$ B mediada por TLR4. Por el contrario, en altas concentraciones, e independientemente del estado de oxidación, manifiesta efectos antiinflamatorios como consecuencia de la represión de TLR4 mediada por activación de PPAR $\gamma$ .

7. La comunicación entre las rutas TLR4 y PPAR $\gamma$  juega un papel clave en la respuesta inflamatoria de acinos pancreáticos a los lípidos mayoritarios. Ambas rutas son potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento de la pancreatitis aguda.

## VII. BIBLIOGRAFÍA





- Abu Hilal M, Armstrong T. The impact of obesity on the course and outcome of acute pancreatitis. *Obes Surg*. 2008;18:326-8.
- Ackroff K, Sclafani A. Effects of the lipase inhibitor orlistat on intake and preference for dietary fat in rats. *Am J Physiol*. 1996;271:R48-54.
- Ahima RS. Connecting obesity, aging and diabetes. *Nat Med*. 2009;15:996-7.
- Ahmed Z, Babaei S, Maguire GF, Draganov D, Kuksis A, La Du BN, et al. Paraoxonase-1 reduces monocyte chemotaxis and adhesion to endothelial cells due to oxidation of palmitoyl, linoleoyl glycerophosphorylcholine. *Cardiovasc Res*. 2003;57:225-31.
- Aho HJ, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions. *Scand J Gastroenterol*. 1980;15:417-24.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:499-511.
- Albelda SS, CW. Ward, PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB journal*. 1994;8:504-12.
- Aly DG, Abdallah IY, Hanafy NS, Elsaie ML, Hafiz NA. Elevated serum leptin levels in nonobese patients with psoriasis. *J Drugs Dermatol*. 2013;12:e25-9.
- Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072:129-57.
- Arai Y, Takayama M, Abe Y, Hirose N. Adipokines and aging. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18:545-50.
- Arnhold J, Osipov AN, Spalteholz H, Panasenko OM, Schiller J. Effects of hypochlorous acid on unsaturated phosphatidylcholines. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:1111-9.
- Arnhold J, Osipov AN, Spalteholz H, Panasenko OM, Schiller J. Formation of lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines under the influence of hypochlorous acid. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1572:91-100.
- Asfaha S, Cenac N, Houle S, Altier C, Papez MD, Nguyen C, et al. Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. *Br J Pharmacol*. 2007;150:176-85.
- Babcock TA, Novak T, Ong E, Jho DH, Helton WS, Espot NJ. Modulation of lipopolysaccharide-stimulated macrophage tumor necrosis factor-alpha production by omega-3 fatty acid is associated with differential cyclooxygenase-2 protein expression and is independent of interleukin-10. *J Surg Res*. 2002;107:135-9.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell*. 1996;87:13-20.
- Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:1751-6.

- Bahceci M, Gokalp D, Bahceci S, Tuzcu A, Atmaca S, Arikan S. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *J Endocrinol Invest*. 2007;30:210-4.
- Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutierrez-Juarez R, Rossetti L, et al. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab*. 2008;8:333-41.
- Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, et al. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013;62:102-11.
- Beasley LE, Koster A, Newman AB, Javaid MK, Ferrucci L, Kritchevsky SB, et al. Inflammation and race and gender differences in computerized tomography-measured adipose depots. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17:1062-9.
- Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg*. 1997;21:130-5.
- Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*. 2008;454:470-7.
- Berliner J. Introduction. Lipid oxidation products and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2002;38:187-91.
- Berliner JA, Subbanagounder G, Leitinger N, Watson AD, Vora D. Evidence for a role of phospholipid oxidation products in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11:142-7.
- Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol*. 2000;190:117-25.
- Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, Frossard JL, Lee HS, Castagliuolo I, et al. Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:4760-5.
- Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, et al. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2005;5:132-44.
- Binder CJ. Naturally occurring IgM antibodies to oxidation-specific epitopes. *Adv Exp Med Biol*. 2012;750:2-13.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37:911-7.
- Blinman TA, Gukovsky I, Mouria M, Zaninovic V, Livingston E, Pandol SJ, et al. Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279:C1993-2003.
- Blüher M. Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Mol Metab*. 2014;3:230-40.

- Blüher M, Mantzoros CS. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism*. 2015;64:131-45.
- Bochkov VN, Kadl A, Huber J, Gruber F, Binder BR, Leitinger N. Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature*. 2002;419:77-81.
- Bochkov VN, Oskolkova OV, Birukov KG, Levonen AL, Binder CJ, Stockl J. Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12:1009-59.
- Bokarewa M, Bokarew D, Hultgren O, Tarkowski A. Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:952-6.
- Bonior J, Jaworek J, Kot M, Konturek SJ, Pierzchalski P. Long-lasting effect of infant rats endotoxemia on heat shock protein 60 in the pancreatic acinar cells: involvement of toll-like receptor 4. *Int J Inflamm*. 2012;2012:354904.
- Borgstrom B. Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. *Biochim Biophys Acta*. 1988;962:308-16.
- Bradley EL. Acute pancreatitis: Diagnosis and therapy. III<sup>a</sup> ed: *Raven Press*. 1994:235-9.
- Brady M, Bhatia M, Christmas S, Boyd MT, Neoptolemos JP, Slavin J. Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis. *Pancreas*. 2002;25:260-9.
- Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, Meier G. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med*. 2002;112:298-304.
- Burdge GC, Calder PC. Dietary alpha-linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. *Nutr Res Rev*. 2006;19:26-52.
- Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52:885-97.
- Calder PC. Fatty acids and immune function: relevance to inflammatory bowel diseases. *Int Rev Immunol*. 2009;28:506-34.
- Calder PC. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol*. 2011;668 Suppl 1:S50-8.
- Calder PC. Long-chain fatty acids and inflammation. *Proc Nutr Soc*. 2012;71:284-9.
- Calder PC, Burdge GC. Fatty acids. Bioactive Lipids In: A Nicolaou and G Kokotos, Eds, *The Oily Press*, Bridgewater. 2004:1-36.
- Calder PC, Yaqoob P. Omega-3 (n-3) fatty acids, cardiovascular disease and stability of atherosclerotic plaques. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2010;56:28-37.

- Cameron JL, Capuzzi DM, Zuidema GD, Margolis S. Acute pancreatitis with hyperlipemia. Evidence for a persistent defect in lipid metabolism. *Am J Med.* 1974;56:482-7.
- Carr AC, van den Berg JJ, Winterbourn CC. Chlorination of cholesterol in cell membranes by hypochlorous acid. *Arch Biochem Biophys.* 1996;332:63-9.
- Carr AC, Vissers MC, Domigan NM, Winterbourn CC. Modification of red cell membrane lipids by hypochlorous acid and haemolysis by preformed lipid chlorohydrins. *Redox Rep.* 1997;3:263-71.
- Ciesla DJ, Moore EE, Johnson JL, Burch JM, Cothren CC, Sauaia A. Obesity increases risk of organ failure after severe trauma. *J Am Coll Surg.* 2006;203:539-45.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005;46:2347-55.
- Closa D, Bulbena O, Hotter G, Rosello-Catafau J, Fernandez-Cruz L, Gelpi E. Xanthine oxidase activation in cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 1994;102:167-70.
- Cole AL, Subbanagounder G, Mukhopadhyay S, Berliner JA, Vora DK. Oxidized phospholipid-induced endothelial cell/monocyte interaction is mediated by a cAMP-dependent R-Ras/PI3-kinase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1384-90.
- Costa Cdos S, Hammes TO, Rohden F, Margis R, Bortolotto JW, Padoin AV, et al. SIRT1 transcription is decreased in visceral adipose tissue of morbidly obese patients with severe hepatic steatosis. *Obes Surg.* 2010;20:633-9.
- Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE, et al. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg.* 2004;14:589-600.
- Court JM, Dunlop ME, Leonard RF. High-frequency oscillation of blood free fatty acid levels in man. *J Appl Physiol.* 1971;31:345-7.
- Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, et al. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ.* 2007;14:1285-94.
- Criddle DN, Murphy J, Fistetto G, Barrow S, Tepikin AV, Neoptolemos JP, et al. Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. *Gastroenterology.* 2006;130:781-93.
- Criddle DN, Raraty MG, Neoptolemos JP, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:10738-43.
- Chaudhary A, Mishra A, Sethi S. Oxidized omega-3 fatty acids inhibit pro-inflammatory responses in glomerular endothelial cells. *Nephron Exp Nephrol.* 2004;97:e136-45.

- Chin KL, Aerbajinai W, Zhu J, Drew L, Chen L, Liu W, et al. The regulation of OLFM4 expression in myeloid precursor cells relies on NF-kappaB transcription factor. *Br J Haematol.* 2008;143:421-32.
- Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 1994;264:1415-21.
- Davies SS, Pontsler AV, Marathe GK, Harrison KA, Murphy RC, Hinshaw JC, et al. Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J Biol Chem.* 2001;276:16015-23.
- De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA, Jr., Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1829-36.
- De Dios I, Perez M, de La Mano A, Sevillano S, Orfao A, Ramudo L, et al. Contribution of circulating leukocytes to cytokine production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis in rats. *Cytokine.* 2002;20:295-303.
- De Dios I, Ramudo L, Alonso JR, Recio JS, Garcia-Montero AC, Manso MA. CD45 expression on rat acinar cells: involvement in pro-inflammatory cytokine production. *FEBS Letters.* 2005;579:6355-60.
- De Dios I, Ramudo L, Garcia-Montero AC, Manso MA. Redox-sensitive modulation of CD45 expression in pancreatic acinar cells during acute pancreatitis. *J Pathol.* 2006;210:234-9.
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem.* 1999;274:32048-54.
- Dettelbach MA, Deftos LJ, Stewart AF. Intraperitoneal free fatty acids induce severe hypocalcemia in rats: a model for the hypocalcemia of pancreatitis. *J Bone Miner Res.* 1990;5:1249-55.
- Dever G, Stewart LJ, Pitt AR, Spickett CM. Phospholipid chlorohydrins cause ATP depletion and toxicity in human myeloid cells. *FEBS Letters.* 2003;540:245-50.
- Dever G, Wainwright CL, Kennedy S, Spickett CM. Fatty acid and phospholipid chlorohydrins cause cell stress and endothelial adhesion. *Acta Biochim Pol.* 2006;53:761-8.
- Dever GJ, Benson R, Wainwright CL, Kennedy S, Spickett CM. Phospholipid chlorohydrin induces leukocyte adhesion to ApoE<sup>-/-</sup> mouse arteries via upregulation of P-selectin. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:452-63.
- Dickey BF, Thrall RS, McCormick JR, Ward PA. Oleic-acid-induced lung injury in the rat. Failure of indomethacin treatment or complement depletion to ablate lung injury. *Am J Pathol.* 1981;103:376-83.

- Ding JL, Zhou ZG, Zhou XY, Zhou B, Wang L, Wang R, et al. Attenuation of acute pancreatitis by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in rats: the effect on Toll-like receptor signaling pathways. *Pancreas*. 2013;42:114-22.
- Domschke S, Malfertheiner P, Uhl W, Buchler M, Domschke W. Free fatty acids in serum of patients with acute necrotizing or edematous pancreatitis. *Int J Pancreatol*. 1993;13:105-10.
- Ehling A, Schaffler A, Herfarth H, Tarner IH, Anders S, Distler O, et al. The potential of adiponectin in driving arthritis. *J Immunol*. 2006;176:4468-78.
- Erridge C, Kennedy S, Spickett CM, Webb DJ. Oxidized phospholipid inhibition of toll-like receptor (TLR) signaling is restricted to TLR2 and TLR4: roles for CD14, LPS-binding protein, and MD2 as targets for specificity of inhibition. *J Biol Chem*. 2008;283:24748-59.
- Escobar J, Pereda J, Lopez-Rodas G, Sastre J. Redox signaling and histone acetylation in acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med*. 2012;52:819-37.
- Fang IM, Yang CH, Yang CM, Chen MS. Comparative effects of fatty acids on proinflammatory gene cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in retinal pigment epithelial cells. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53:739-50.
- Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:911-9; quiz 20.
- Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 2000;68:437-46.
- Feige E, Mendel I, George J, Yacov N, Harats D. Modified phospholipids as anti-inflammatory compounds. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21:525-9.
- Field CJ, Angel A, Clandinin MT. Relationship of diet to the fatty acid composition of human adipose tissue structural and stored lipids. *Am J Clin Nutr*. 1985;42:1206-20.
- Finstad HS, Kolset SO, Holme JA, Wiger R, Farrants AK, Blomhoff R, et al. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on proliferation and differentiation of promyelocytic leukemic HL-60 cells. *Blood*. 1994;84:3799-809.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991;147:3815-22.
- Folch-Puy E, Granell S, Dagorn JC, Iovanna JL, Closa D. Pancreatitis-associated protein I suppresses NF-kappa B activation through a JAK/STAT-mediated mechanism in epithelial cells. *J Immunol*. 2006a;176:3774-9.
- Folch-Puy E, Granell S, Iovanna JL, Barthet M, Closa D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist reduces the severity of post-ERCP pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol*. 2006b;12:6458-63.
- Folch E, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Closa D. Free radicals generated by xanthine oxidase mediate pancreatitis-associated organ failure. *Dig Dis Sci*. 1998;43:2405-10.

- Folch E, Salas A, Panes J, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Anderson DC, et al. Role of P-selectin and ICAM-1 in pancreatitis-induced lung inflammation in rats: significance of oxidative stress. *Ann Surg.* 1999;230:792-8; discussion 8-9.
- Folkes LK, Candeias LP, Wardman P. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Arch Biochem Biophys.* 1995;323:120-6.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995;83:803-12.
- Fowden L. The occurrence and metabolism of carbon-halogen compounds. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1968;171:5-18.
- Franco-Pons N, Casas J, Fabrias G, Gea-Sorli S, de-Madaria E, Gelpi E, et al. Fat necrosis generates proinflammatory halogenated lipids during acute pancreatitis. *Ann Surg.* 2013;257:943-51.
- Franco-Pons N, Gea-Sorli S, Closa D. Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis. *J Pathol.* 2010;221:175-82.
- Fredrikson G, Stralfors P, Nilsson NO, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J Biol Chem.* 1981;256:6311-20.
- Frossard JL, Hadengue A, Pastor CM. New serum markers for the detection of severe acute pancreatitis in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:162-70.
- Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, et al. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology.* 1999;116:694-701.
- Fu P, Birukov KG. Oxidized phospholipids in control of inflammation and endothelial barrier. *Transl Res.* 2009;153:166-76.
- Fuller NJ, Hardingham CR, Graves M, Screatton N, Dixon AK, Ward LC, et al. Assessment of limb muscle and adipose tissue by dual-energy X-ray absorptiometry using magnetic resonance imaging for comparison. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23:1295-302.
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001;294:1871-5.
- Gaisano HY. A hypothesis: SNARE-ing the mechanisms of regulated exocytosis and pathologic membrane fusions in the pancreatic acinar cell. *Pancreas.* 2000;20:217-26.
- Gargouri Y, Chahinian H, Moreau H, Ransac S, Verger R. Inactivation of pancreatic and gastric lipases by THL and C12:0-TNB: a kinetic study with emulsified tributyrin. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1085:322-8.
- Gea-Sorli S, Bonjoch L, Closa D. Differences in the inflammatory response induced by acute pancreatitis in different white adipose tissue sites in the rat. *PLoS One.* 2012;7:e41933.

- Ghanem AM, Sen S, Philp B, Dziewulski P, Shelley OP. Body Mass Index (BMI) and mortality in patients with severe burns: is there a "tilt point" at which obesity influences outcome? *Burns*. 2011;37:208-14.
- Gharavi NM, Alva JA, Mouillesseaux KP, Lai C, Yeh M, Yeung W, et al. Role of the Jak/STAT pathway in the regulation of interleukin-8 transcription by oxidized phospholipids in vitro and in atherosclerosis in vivo. *J Biol Chem*. 2007;282:31460-8.
- Ghosh HS, Spencer JV, Ng B, McBurney MW, Robbins PD. Sirt1 interacts with transducin-like enhancer of split-1 to inhibit nuclear factor kappaB-mediated transcription. *Biochem J*. 2007;408:105-11.
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002;109 Suppl:S81-96.
- Gironella M, Folch-Puy E, LeGoffic A, Garcia S, Christa L, Smith A, et al. Experimental acute pancreatitis in PAP/HIP knock-out mice. *Gut*. 2007;56:1091-7.
- Gomez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, Cassinello N, Camps B, Vina J, et al. Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002;1:393-403.
- Gonzalez A, Camello PJ, Pariente JA, Salido GM. Free cytosolic calcium levels modify intracellular pH in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;230:652-6.
- Greig FH, Kennedy S, Spickett CM. Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2012;52:266-80.
- Gukovsky I, Reyes CN, Vaquero EC, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284:G85-95.
- Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J Neurochem*. 2012;120:1060-71.
- Gutierrez PT, Folch-Puy E, Bulbena O, Closa D. Oxidised lipids present in ascitic fluid interfere with the regulation of the macrophages during acute pancreatitis, promoting an exacerbation of the inflammatory response. *Gut*. 2008;57:642-8.
- Gutmann I, Wahlefel AW. L-(+)-lactate determination with lactatodehydrogenase and NAD. In: *Methods of enzymatic analysis* Bergmeyer, HU, (Ed) New York, *Academic Press*. 1974:1464-8.
- Gwinn MR, Vallyathan V. Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2006;9:27-39.
- Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T, et al. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest*. 2000;106:773-81.



- Hambleton J, Weinstein SL, Lem L, DeFranco AL. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2774-8.
- Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13:413-21.
- Harris WS, Mozaffarian D, Rimm E, Kris-Etherton P, Rudel LL, Appel LJ, et al. Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2009;119:902-7.
- Hashimoto K, Ethridge RT, Saito H, Rajaraman S, Evers BM. The PPARgamma ligand, 15d-PGJ2, attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *Pancreas*. 2003;27:58-66.
- Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*. 2001;2:239-54.
- Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids*. 2003;25:259-74.
- Hawkins RA, Sangster K, Arends MJ. Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. *J Pathol*. 1998;185:61-70.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374:1-20.
- Hennig B, Lei W, Arzuaga X, Ghosh DD, Saraswathi V, Toborek M. Linoleic acid induces proinflammatory events in vascular endothelial cells via activation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling. *J Nutr Biochem*. 2006;17:766-72.
- Hennig B, Toborek M, Joshi-Barve S, Barger SW, Barve S, Mattson MP, et al. Linoleic acid activates nuclear transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and induces NF-kappa B-dependent transcription in cultured endothelial cells. *Am J Clin Nutr*. 1996;63:322-8.
- Hickson JC. The secretion of pancreatic juice in response to stimulation of the vagus nerves in the pig. *J Physiol*. 1970;206:275-97.
- Holm C, Kirchgessner TG, Svenson KL, Fredrikson G, Nilsson S, Miller CG, et al. Hormone-sensitive lipase: sequence, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science*. 1988;241:1503-6.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995;95:2409-15.
- Howard TJ, Patel JB, Zyromski N, Sandrasegaran K, Yu J, Nakeeb A, et al. Declining morbidity and mortality rates in the surgical management of pancreatic necrosis. *J Gastrointest Surg*. 2007;11:43-9.

- Hughes CB, Grewal HP, Gaber LW, Kotb M, El-din AB, Mann L, et al. Anti-TNF $\alpha$  therapy improves survival and ameliorates the pathophysiologic sequelae in acute pancreatitis in the rat. *Am J Surg*. 1996;171:274-80.
- Hussain N, Wu F, Zhu L, Thrall RS, Kresch MJ. Neutrophil apoptosis during the development and resolution of oleic acid-induced acute lung injury in the rat. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19:867-74.
- Im DS. Omega-3 fatty acids in anti-inflammation (pro-resolution) and GPCRs. *Prog Lipid Res*. 2012;51:232-7.
- Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*. 2008;133:235-49.
- Innis SM. Dietary lipids in early development: relevance to obesity, immune and inflammatory disorders. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2007;14:359-64.
- Ishida T, Yoshida M, Arita M, Nishitani Y, Nishiumi S, Masuda A, et al. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:87-95.
- Ito K, Mizutani A, Kira S, Mori M, Iwasaka H, Noguchi T. Effect of Ulinastatin, a human urinary trypsin inhibitor, on the oleic acid-induced acute lung injury in rats via the inhibition of activated leukocytes. *Injury*. 2005;36:387-94.
- Jang S, Jung JC, Kim DH, Ryu JH, Lee Y, Jung M, et al. The neuroprotective effects of benzylideneacetophenone derivatives on excitotoxicity and inflammation via phosphorylated Janus tyrosine kinase 2/phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 and mitogen-activated protein K pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328:435-47.
- Jerlich A, Pitt AR, Schaur RJ, Spickett CM. Pathways of phospholipid oxidation by HOCl in human LDL detected by LC-MS. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:673-82.
- Jiang YF, Vaccaro MI, Fiedler F, Calvo EL, Iovanna JL. Lipopolysaccharides induce p8 mRNA expression in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;260:686-90.
- Jiménez Forero SJ, Roa Saavedra DX, Villalba MC. Pancreatitis aguda secundaria a hipertrigliceridemia: presentación de dos casos clínicos. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2008;100:367-71.
- Johnson GH, Fritsche K. Effect of dietary linoleic acid on markers of inflammation in healthy persons: a systematic review of randomized controlled trials. *J Acad Nutr Diet*. 2012;112:1029-41, 41 e1-15.
- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006;116:1784-92.
- Kammoun HL, Kraakman MJ, Febbraio MA. Adipose tissue inflammation in glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15:31-44.

- Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2014.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2548-56.
- Khalfoun B, Thibault F, Watier H, Bardos P, Lebranchu Y. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol*. 1997;400B:589-97.
- Khan J, Solakivi T, Seppanen H, Lappalainen-Lehto R, Jarvinen S, Ronkainen J, et al. Serum lipid and fatty acid profiles are highly changed in patients with alcohol induced acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2012;12:44-8.
- Khan SA, Ali A, Khan SA, Zahran SA, Damanhour G, Azhar E, et al. Unraveling the complex relationship triad between lipids, obesity, and inflammation. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:502749.
- Kim HS, Cho IH, Kim JE, Shin YJ, Jeon JH, Kim Y, et al. Ethyl pyruvate has an anti-inflammatory effect by inhibiting ROS-dependent STAT signaling in activated microglia. *Free Radic Biol Med*. 2008;45:950-63.
- Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1304-10.
- Kong W, Yen JH, Vassiliou E, Adhikary S, Toscano MG, Ganea D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and in vitro and in vivo expression of the IL-12 cytokine family. *Lipids Health Dis*. 2010;9:12.
- Koonen DP, Glatz JF, Bonen A, Luiken JJ. Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1736:163-80.
- Kopprasch S, Leonhardt W, Pietzsch J, Kuhne H. Hypochlorite-modified low-density lipoprotein stimulates human polymorphonuclear leukocytes for enhanced production of reactive oxygen metabolites, enzyme secretion, and adhesion to endothelial cells. *Atherosclerosis*. 1998;136:315-24.
- Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Front Immunol*. 2014;5:470.
- Krebs M, Stingl H, Nowotny P, Weghuber D, Bischof M, Waldhausl W, et al. Prevention of in vitro lipolysis by tetrahydrolipstatin. *Clin Chem*. 2000;46:950-4.
- Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. Cytokines and acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 1996;110:639-42.
- Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18:313-25.

- Laine PS, Schwartz EA, Wang Y, Zhang WY, Karnik SK, Musi N, et al. Palmitic acid induces IP-10 expression in human macrophages via NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358:150-5.
- Lands WE. Dietary fat and health: the evidence and the politics of prevention: careful use of dietary fats can improve life and prevent disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1055:179-92.
- Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis. *Lancet.* 2015;386:85-96.
- Lau HY, Bhatia M. Effect of CP-96,345 on the expression of adhesion molecules in acute pancreatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292:G1283-92.
- Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001;276:16683-9.
- Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, et al. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J Biol Chem.* 2004;279:16971-9.
- Lee PC, Howard JM. Fat necrosis. *Surg Gynecol Obstet.* 1979;148:785-9.
- Lee Y, Naseem RH, Park BH, Garry DJ, Richardson JA, Schaffer JE, et al. Alpha-lipoic acid prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA-synthase transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344:446-52.
- Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14:421-30.
- Leitinger N. The role of phospholipid oxidation products in inflammatory and autoimmune diseases: evidence from animal models and in humans. *Subcell Biochem.* 2008;49:325-50.
- Leitinger N, Tyner TR, Oslund L, Rizza C, Subbanagounder G, Lee H, et al. Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of monocytes and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:12010-5.
- Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M, et al. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 1991;101:782-5.
- Li JZ, Wu JH, Yu SY, Shao QR, Dong XM. Inhibitory effects of paeoniflorin on lysophosphatidylcholine-induced inflammatory factor production in human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Med.* 2013;31:493-7.
- Li L, Wang XP, Wu K. The therapeutic effect of oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine in rodents with acute necrotizing pancreatitis and its mechanism. *Pancreas.* 2007;35:e27-36.
- Li Y, Zhou ZG, Xia QJ, Zhang J, Li HG, Cao GQ, et al. Toll-like receptor 4 detected in exocrine pancreas and the change of expression in cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas.* 2005;30:375-81.

- Liu HS, Pan CE, Liu QG, Yang W, Liu XM. Effect of NF-kappaB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2003;9:2513-8.
- Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 1998;12:57-65.
- Lopez-Vicario C, Rius B, Alcaraz-Quiles J, Garcia-Alonso V, Lopategi A, Titos E, et al. Pro-resolving mediators produced from EPA and DHA: Overview of the pathways involved and their mechanisms in metabolic syndrome and related liver diseases. *Eur J Pharmacol*. 2015.
- Lowe ME. The triglyceride lipases of the pancreas. *J Lipid Res*. 2002;43:2007-16.
- Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*. 2008;57:3239-46.
- Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007;56:16-23.
- Mackman N, Brand K, Edgington TS. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J Exp Med*. 1991;174:1517-26.
- Madiehe AM, Mitchell TD, Harris RB. Hyperleptinemia and reduced TNF-alpha secretion cause resistance of db/db mice to endotoxin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284:R763-70.
- Magdalon J, Vinolo MA, Rodrigues HG, Paschoal VA, Torres RP, Mancini-Filho J, et al. Oral administration of oleic or linoleic acids modulates the production of inflammatory mediators by rat macrophages. *Lipids*. 2012;47:803-12.
- Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002;9:401-10.
- Malis CD, Bonventre JV. Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. A model for post-ischemic and toxic mitochondrial damage. *J Biol Chem*. 1986;261:14201-8.
- Malle E, Furtmuller PG, Sattler W, Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol*. 2007;152:838-54.
- Mann JI, Skeaff CM. Energy and macronutrients. Lipids. In: Mann, J.I., Truswell, A.S. editors. *Essentials of human nutrition*. Oxford University Press. 1998.
- March J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*. McGraw-Hill, Kogakusha, Tokyo. 1977.
- Mariotto S, Suzuki Y, Persichini T, Colasanti M, Suzuki H, Cantoni O. Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. *Curr Med Chem*. 2007;14:1940-4.

- Martinez J, Johnson CD, Sanchez-Paya J, de Madaria E, Robles-Diaz G, Perez-Mateo M. Obesity is a definitive risk factor of severity and mortality in acute pancreatitis: an updated meta-analysis. *Pancreatology*. 2006;6:206-9.
- Masamune A, Satoh K, Sakai Y, Yoshida M, Satoh A, Shimosegawa T. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma induce apoptosis in AR42J cells. *Pancreas*. 2002;24:130-8.
- Matarese G, Carrieri PB, Montella S, De Rosa V, La Cava A. Leptin as a metabolic link to multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2010;6:455-61.
- Mathur A, Marine M, Lu D, Swartz-Basile DA, Saxena R, Zyromski NJ, et al. Nonalcoholic fatty pancreas disease. *HPB (Oxford)*. 2007;9:312-8.
- Matsuzawa Y. Adiponectin: a key player in obesity related disorders. *Curr Pharm Des*. 2010;16:1896-901.
- Matt U, Sharif O, Martins R, Knapp S. Accumulating evidence for a role of oxidized phospholipids in infectious diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72:1059-71.
- Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;314:1-16.
- McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:1775-89.
- McFadden DW. Organ failure and multiple organ system failure in pancreatitis. *Pancreas*. 1991;6 Suppl 1:S37-43.
- McKay CJ, Curran F, Sharples C, Baxter JN, Imrie CW. Prospective placebo-controlled randomized trial of lexipafant in predicted severe acute pancreatitis. *Br J Surg*. 1997;84:1239-43.
- McKay CJ, Gallagher G, Brooks B, Imrie CW, Baxter JN. Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis. *Br J Surg*. 1996;83:919 - 23.
- Mery CM, Rubio V, Duarte-Rojo A, Suazo-Barahona J, Pelaez-Luna M, Milke P, et al. Android fat distribution as predictor of severity in acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2002;2:543-9.
- Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med*. 2009;15:1082-7.
- Mitchell CJ, Playforth MJ, Kelleher J, McMahon MJ. Functional recovery of the exocrine pancreas after acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 1983;18:5-8.
- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA*. 2003;289:76-9.
- Moreno-Aliaga MJ, Lorente-Cebrian S, Martinez JA. Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids. *Proc Nutr Soc*. 2010;69:324-32.

- Morita Y, Yoshikawa T, Takeda S, Matsuyama K, Takahashi S, Yoshida N, et al. Involvement of lipid peroxidation in free fatty acid-induced isolated rat pancreatic acinar cell injury. *Pancreas*. 1998;17:383-9.
- Mossner J, Bodeker H, Kimura W, Meyer F, Bohm S, Fischbach W. Isolated rat pancreatic acini as a model to study the potential role of lipase in the pathogenesis of acinar cell destruction. *Int J Pancreatol*. 1992;12:285-96.
- Navina S, Acharya C, DeLany JP, Orlichenko LS, Baty CJ, Shiva SS, et al. Lipotoxicity causes multisystem organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity. *Sci Transl Med*. 2011;3:107ra10.
- Nguyen-Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, Canteloup S, Kebede M, Lacour B, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces macrophage respiratory burst via its protein moiety: A novel pathway in atherogenesis? *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263:804-9.
- Nguyen MT, Chen A, Lu WJ, Fan W, Li PP, Oh DY, et al. Regulation of chemokine and chemokine receptor expression by PPARgamma in adipocytes and macrophages. *PLoS One*. 2012;7:e34976.
- Nguyen MT, Favellyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2007;282:35279-92.
- Noel P, Patel K, Durgampudi C, Trivedi RN, de Oliveira C, Crowell MD, et al. Peripancreatic fat necrosis worsens acute pancreatitis independent of pancreatic necrosis via unsaturated fatty acids increased in human pancreatic necrosis collections. *Gut*. 2014.
- Noelting G, Bernfeld P. Sur les enzymes amylolytiques III. La alpha-amylase, dosage d'activité et contrôle de l'absence de beta-amylase. *Helv Chim Acta*. 1948;31:286-90.
- Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T. Changes in lipid peroxide and oxygen radical scavengers in cerulein-induced acute pancreatitis. Imbalance between the offense and defense systems. *Digestion*. 1990;47:130-7.
- Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg*. 1998;175:76-83.
- Ohashi S, Nishio A, Nakamura H, Kido M, Ueno S, Uza N, et al. Protective roles of redox-active protein thioredoxin-1 for severe acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G772-81.
- Orlichenko LS, Behari J, Yeh TH, Liu S, Stolz DB, Saluja AK, et al. Transcriptional regulation of CXC-ELR chemokines KC and MIP-2 in mouse pancreatic acini. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G867-76.
- Oskolkova OV, Afonyushkin T, Preinerstorfer B, Bicker W, von Schlieffen E, Hainzl E, et al. Oxidized phospholipids are more potent antagonists of lipopolysaccharide than inducers of inflammation. *J Immunol*. 2010;185:7706-12.

- Panasenko OM, Spalteholz H, Schiller J, Arnhold J. Myeloperoxidase-induced formation of chlorohydrins and lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:553-62.
- Papackova Z, Cahova M. Fatty acid signaling: the new function of intracellular lipases. *Int J Mol Sci.* 2015;16:3831-55.
- Pappas TN, Gavino VC, Ellison EC, Cornwell DG, Pace WG, Carey LC. Concentration of free fatty acids in pancreatitis-associated ascitic fluid. *Clin Chem.* 1981;27:358.
- Parhami F, Fang ZT, Fogelman AM, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA. Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest.* 1993;92:471-8.
- Pattison DI, Davies MJ. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Curr Med Chem.* 2006;13:3271-90.
- Paye F, Chariot J, Molas G, Benessiano J, Roze C. Nonesterified fatty acids in acute cerulein-induced pancreatitis in the rat. Are they really deleterious in vivo? *Dig Dis Sci.* 1995;40:540-5.
- Peery AF, Dellon ES, Lund J, Crockett SD, McGowan CE, Bulsiewicz WJ, et al. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology.* 2012;143:1179-87.e1-3.
- Pereda J, Perez S, Escobar J, Arduini A, Asensi M, Serviddio G, et al. Obese rats exhibit high levels of fat necrosis and isoprostanes in taurocholate-induced acute pancreatitis. *PLoS One.* 2012;7:e44383.
- Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Vina J, et al. Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Curr Med Chem.* 2006;13:2775-87.
- Pérez-Garrido S. Papel del estrés oxidativo y del tejido adiposo en la pancreatitis aguda experimental. *Tesis Doctoral*, Universidad de Valencia. 2013.
- Peterfy M, Phan J, Reue K. Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis. *J Biol Chem.* 2005;280:32883-9.
- Pinnick KE, Collins SC, Londos C, Gauguier D, Clark A, Fielding BA. Pancreatic ectopic fat is characterized by adipocyte infiltration and altered lipid composition. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16:522-30.
- Pittman RC, Khoo JC, Steinberg D. Cholesterol esterase in rat adipose tissue and its activation by cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1975;250:4505-11.
- Poch B, Gansauge F, Rau B, Wittel U, Gansauge S, Nussler AK, et al. The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation. *FEBS Letters.* 1999;461:268-72.



- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282:2085-8.
- Popov D, Simionescu M, Shepherd PR. Saturated-fat diet induces moderate diabetes and severe glomerulosclerosis in hamsters. *Diabetologia*. 2003;46:1408-18.
- Porter KA, Banks PA. Obesity as a predictor of severity in acute pancreatitis. *Int J Pancreatol*. 1991;10:247-52.
- Prutz WA. Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Arch Biochem Biophys*. 1996;332:110-20.
- Qiao L, Shao J. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem*. 2006;281:39915-24.
- Ramnath RD, Bhatia M. Substance P treatment stimulates chemokine synthesis in pancreatic acinar cells via the activation of NF-kappaB. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291:G1113-9.
- Ramudo L, De Dios I, Yubero S, Vicente S, Manso MA. ICAM-1 and CD11b/CD18 expression during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction: effect of N-acetylcysteine. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007;232:737-43.
- Ramudo L, Manso MA, Sevillano S, De Dios I. Kinetic study of TNF-alpha production and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction. *J Pathol*. 2005a;206:9-16.
- 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*. 2005b;32:125-31.
- Ramudo L, Yubero S, Manso MA, Vicente S, De Dios I. Signal transduction of MCP-1 expression induced by pancreatitis-associated ascitic fluid in pancreatic acinar cells. *J Cell Mol Med*. 2009;13:1314-20.
- Ranson JH, Turner JW, Roses DF, Rifkind KM, Spencer FC. Respiratory complications in acute pancreatitis. *Ann Surg*. 1974;179:557-66.
- Reddy S, Hama S, Grijalva V, Hassan K, Mottahedeh R, Hough G, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 activity is necessary for oxidized phospholipids to induce monocyte chemotactic activity in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276:17030-5.
- Reddy ST, Grijalva V, Ng C, Hassan K, Hama S, Mottahedeh R, et al. Identification of genes induced by oxidized phospholipids in human aortic endothelial cells. *Vascul Pharmacol*. 2002;38:211-8.
- Reinheckel T, Prause J, Nedelev B, Augustin W, Schulz HU, Lippert H, et al. Oxidative stress affects pancreatic proteins during the early pathogenesis of rat caerulein pancreatitis. *Digestion*. 1999;60:56-62.

- Reue K, Zhang P. The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression. *FEBS Letters*. 2008;582:90-6.
- Rhee SH, Hwang D. Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. *J Biol Chem*. 2000;275:34035-40.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998;391:79-82.
- Roberts SE, Akbari A, Thorne K, Atkinson M, Evans PA. The incidence of acute pancreatitis: impact of social deprivation, alcohol consumption, seasonal and demographic factors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38:539-48.
- Robinson JG, Stone NJ. Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol*. 2006;98:39i-49i.
- Rodgers JT, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:12861-6.
- Romano M, Claria J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J*. 2003;17:1986-95.
- Romero MM, Fernandez-Lopez JA, Esteve M, Alemany M. Different modulation by dietary restriction of adipokine expression in white adipose tissue sites in the rat. *Cardiovasc Diabetol*. 2009;8:42.
- Russell SJ, Kahn CR. Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:681-91.
- Ruthenb urger M, Kr uger B, Halangk W, Lerch MM. Intracellular pro-elastase but not trypsinogen activation is associated with acinar cell injury. *Pancreas*. 2000;21(4):474.
- Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Frossard JL, Steer ML. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*. 1999;276:G835-42.
- Saluja AK, Saluja, M., Printz, H., Zaverinik, A., Sengupta, A., Steer, M.L. Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:8968-71.
- Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. 1987;237:1171-6.
- Sandoval J, Escobar J, Pereda J, Sacilotto N, Rodriguez JL, Sabater L, et al. Pentoxifylline prevents loss of PP2A phosphatase activity and recruitment of histone acetyltransferases to proinflammatory genes in acute pancreatitis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331:609-17.

- Sandoval J, Pereda J, Rodriguez JL, Escobar J, Hidalgo J, Joosten LA, et al. Ordered transcriptional factor recruitment and epigenetic regulation of tnf-alpha in necrotizing acute pancreatitis. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:1687-97.
- Satoh A, Gukovskaya AS, Edderkaoui M, Daghighian MS, Reeve JR, Jr., Shimosegawa T, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates pancreatitis responses in acinar cells via protein kinase C and proline-rich tyrosine kinase 2. *Gastroenterology.* 2005;129:639-51.
- Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzaki M, Nakajima T, et al. Role of toll-like receptor 4 in the pathophysiology of severe acute pancreatitis in mice. *Surg Today.* 2007;37:867-73.
- Schafer C, Williams JA. Stress kinases and heat shock proteins in the pancreas: possible roles in normal function and disease. *J Gastroenterol.* 2000;35:1-9.
- Scheele G, Adler G, Kern H. Exocytosis Occurs at the Lateral Plasma Membrane of the Pancreatic Acinar Cell During Supramaximal Secretagogue Stimulation. *Gastroenterology.* 1987;92:345-53.
- Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23:407-15.
- Schmitz-Moormann P. Comparative radiological and morphological study of the human pancreas. IV. Acute necrotizing pancreatitis in man. *Pathol Res Pract.* 1981;171:325-35.
- Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2008;47:147-55.
- Schoenberg MH, Buchler M, Beger HG. Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Hepato-gastroenterology.* 1994;41:313-9.
- Schulz HU, Niederau C, Klonowski-Stumpe H, Halangk W, Luthen R, Lippert H. Oxidative stress in acute pancreatitis. *Hepato-gastroenterology.* 1999;46:2736-50.
- Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature.* 2007;447:869-74.
- Segersvard R, Sylvan M, Herrington M, Larsson J, Permert J. Obesity increases the severity of acute experimental pancreatitis in the rat. *Scand J Gastroenterol.* 2001;36:658-63.
- Segersvard R, Tsai JA, Herrington MK, Wang F. Obesity alters cytokine gene expression and promotes liver injury in rats with acute pancreatitis. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16:23-8.
- Sempere L, Martinez J, de Madaria E, Lozano B, Sanchez-Paya J, Jover R, et al. Obesity and fat distribution imply a greater systemic inflammatory response and a worse prognosis in acute pancreatitis. *Pancreatol.* 2008;8:257-64.
- Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:101-37.

- Sha T, Sunamoto M, Kitazaki T, Sato J, Ii M, Iizawa Y. Therapeutic effects of TAK-242, a novel selective Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, in mouse endotoxin shock model. *Eur J Pharmacol.* 2007;571:231-9.
- Shaikh SR, Jolly CA, Chapkin RS. n-3 Polyunsaturated fatty acids exert immunomodulatory effects on lymphocytes by targeting plasma membrane molecular organization. *Mol Aspects Med.* 2012;33:46-54.
- Sharif R, Dawra R, Wasiluk K, Phillips P, Dudeja V, Kurt-Jones E, et al. Impact of toll-like receptor 4 on the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury in mice. *Gut.* 2009;58:813-9.
- Shiose A, Sumimoto H. Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 2000;275:13793-801.
- Silvennoinen O, Schindler C, Schlessinger J, Levy DE. Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation. *Science.* 1993;261:1736-9.
- Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr.* 1999;70:560S-9S.
- Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008a;233:674-88.
- Simopoulos AP. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008b;17 Suppl 1:131-4.
- Siriwardhana N, Kalupahana NS, Fletcher S, Xin W, Claycombe KJ, Quignard-Boulangé A, et al. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids differentially regulate adipose angiotensinogen and other inflammatory adipokines in part via NF-kappaB-dependent mechanisms. *J Nutr Biochem.* 2012;23:1661-7.
- Snel M, Jonker JT, Schoones J, Lamb H, de Roos A, Pijl H, et al. Ectopic fat and insulin resistance: pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:983814.
- Snyder WS, Cook MJ, Nasset ES, R.L. K, Howells GP, Tipton IH. Report of the task group on reference man. *Ann ICRP.* 1975;23:273.
- Solinas G, Naugler W, Galimi F, Lee MS, Karin M. Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:16454-9.
- Song M, Kim YJ, Ryu JC. Phospholipidosis induced by PPARgamma signaling in human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells exposed to amiodarone. *Toxicol Sci.* 2011;120:98-108.
- Spickett CM. Chlorinated lipids and fatty acids: an emerging role in pathology. *Pharmacol Ther.* 2007;115:400-9.

- Stofkova A. Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocr Regul.* 2009;43:157-68.
- Stokes KY, Granger DN. The microcirculation: a motor for the systemic inflammatory response and large vessel disease induced by hypercholesterolaemia? *J Physiol.* 2005;562:647-53.
- Strande JL, Phillips SA. Thrombin increases inflammatory cytokine and angiogenic growth factor secretion in human adipose cells in vitro. *J Inflamm (Lond).* 2009;6:4.
- Suazo-Barahona J, Carmona-Sanchez R, Robles-Diaz G, Milke-Garcia P, Vargas-Vorackova F, Uscanga-Dominguez L, et al. Obesity: a risk factor for severe acute biliary and alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 1998;93:1324-8.
- Subbanagounder G, Deng Y, Borromeo C, Dooley AN, Berliner JA, Salomon RG. Hydroxy alkenal phospholipids regulate inflammatory functions of endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* 2002;38:201-9.
- Subbanagounder G, Leitinger N, Schwenke DC, Wong JW, Lee H, Rizza C, et al. Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids. Specific oxidized fatty acyl groups at the sn-2 position. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2248-54.
- Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2062-8.
- Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol.* 2010;88:33-9.
- Sun LK, Reding T, Bain M, Heikenwalder M, Bimmler D, Graf R. Prostaglandin E2 modulates TNF-alpha-induced MCP-1 synthesis in pancreatic acinar cells in a PKA-dependent manner. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293:G1196-204.
- Suzuki M, Shinohara Y, Ohsaki Y, Fujimoto T. Lipid droplets: size matters. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2011;60 Suppl 1:S101-16.
- Sztefko K, Panek J. Serum free fatty acid concentration in patients with acute pancreatitis. *Pancreatol.* 2001;1:230-6.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.
- Tang CH, Chiu YC, Tan TW, Yang RS, Fu WM. Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway. *J Immunol.* 2007;179:5483-92.
- Tashiro M, Nakamura H, Taguchi M, Yamaguchi T, Yoshikawa H, Fukumitsu K, et al. Oleic acid-induced pancreatitis alters expression of transforming growth factor-beta1 and extracellular matrix components in rats. *Pancreas.* 2003;26:197-204.
- Thien FCK, De Luca S, Woods RK, Abramson MJ. Cochrane Review: Dietary marine fatty acids (fish oil) for asthma in adults and children. *Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal.* 2011;6:984-1012.

- Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med.* 2008;14:222-31.
- Toborek M, Barger SW, Mattson MP, Barve S, McClain CJ, Hennig B. Linoleic acid and TNF-alpha cross-amplify oxidative injury and dysfunction of endothelial cells. *J Lipid Res.* 1996;37:123-35.
- Toborek M, Lee YW, Garrido R, Kaiser S, Hennig B. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:119-25.
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* 1998;93:241-52.
- Toskes PP. Hyperlipidemic pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 1990;19:783-91.
- Toussiro E, Streit G, Wendling D. The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Curr Med Chem.* 2007;14:1095-100.
- Tracy RP. Is visceral adiposity the "enemy within"? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:881-3.
- Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V, et al. Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335:1254-63.
- Uhl W, Warshaw A, Imrie C, Bassi C, McKay CJ, Lankisch PG, et al. IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis. *Pancreatology.* 2002;2:565-73.
- Uruñuela A, Manso MA, de la Mano AM, Sevillano S, Orfao A, De Dios I. Asynchronous impairment of calcium homeostasis in different acinar cells after pancreatic duct obstruction in rat. *Clin Sci (Lond).* 2002a;102:615-22.
- Uruñuela A, Manso MA, Ma Pinto R, Orfao A, De Dios I. Enzyme load in pancreatic acinar cells is increased in the early stages of acute pancreatitis induced by duct obstruction in rats. *Clin Sci (Lond).* 2000;98:143-50.
- 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.* 2002b;1588:159-64.
- Vadacca M, Margiotta DP, Navarini L, Afeltra A. Leptin in immuno-rheumatological diseases. *Cell Mol Immunol.* 2011;8:203-12.
- Valdearcos M, Esquinas E, Meana C, Gil-de-Gomez L, Guijas C, Balsinde J, et al. Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J Immunol.* 2011;186:6004-13.
- Valdearcos M, Esquinas E, Meana C, Pena L, Gil-de-Gomez L, Balsinde J, et al. Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *J Biol Chem.* 2012;287:10894-904.

- Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M, Fogelman AM. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J Biol Chem*. 2001;276:1923-9.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:112-24.
- Vance JE. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *J Lipid Res*. 2008;49:1377-87.
- Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280:G1197-208.
- Vasseur S, Folch-Puy E, Hlouschek V, Garcia S, Fiedler F, Lerch MM, et al. p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I. *J Biol Chem*. 2004;279:7199-207.
- Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation*. 2003;108:736-40.
- Viedma JA, Perez-Mateo M, Dominguez JE, Carballo F. Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A. *Gut*. 1992;33:1264-7.
- Villarreal-Molina MT, Antuna-Puente B. Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie*. 2012;94:2143-9.
- Villena JA, Cousin B, Penicaud L, Casteilla L. Adipose tissues display differential phagocytic and microbicidal activities depending on their localization. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25:1275-80.
- Voet D, Voet J, Pratt C. Fundamentos de bioquímica. La vida a nivel molecular: Ed. *Med. Panamericana*; 2007.
- Volpe CM, Nogueira-Machado JA. The dual role of free fatty acid signaling in inflammation and therapeutics. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2013;7:189-97.
- Vollmar B, Waldner H, Schmand J, Conzen PF, Goetz AE, Habazettl H, et al. Oleic acid induced pancreatitis in pigs. *J Surg Res*. 1991;50:196-204.
- von Schlieffen E, Oskolkova OV, Schabbauer G, Gruber F, Bluml S, Genest M, et al. Multi-hit inhibition of circulating and cell-associated components of the toll-like receptor 4 pathway by oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:356-62.
- Walton KA, Hsieh X, Gharavi N, Wang S, Wang G, Yeh M, et al. Receptors involved in the oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine-mediated synthesis of interleukin-8. A role for Toll-like receptor 4 and a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *J Biol Chem*. 2003;278:29661-6.

- Wang ZM, Pierson RN, Jr., Heymsfield SB. The five-level model: a new approach to organizing body-composition research. *Am J Clin Nutr.* 1992;56:19-28.
- Ward JB, Sutton R, Jenkins SA, Petersen OH. Progressive disruption of acinar cell calcium signaling is an early feature of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology.* 1996;111:481-91.
- Weatherill AR, Lee JY, Zhao L, Lemay DG, Youn HS, Hwang DH. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol.* 2005;174:5390-7.
- Wei S, Lai K, Patel S, Piantedosi R, Shen H, Colantuoni V, et al. Retinyl ester hydrolysis and retinol efflux from BFC-1beta adipocytes. *J Biol Chem.* 1997;272:14159-65.
- Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294:R673-80.
- Weinstein SL, Sanghera JS, Lemke K, DeFranco AL, Pelech SL. Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J Biol Chem.* 1992;267:14955-62.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112:1796-808.
- Weiss SB, Smith SW, Kennedy EP. The enzymatic formation of lecithin from cytidine diphosphate choline and D-1,2-diglyceride. *J Biol Chem.* 1958;231:53-64.
- Wereszczynska-Siemiatkowska U, Dabrowski A, Jedynek M, Gabryelewicz A. Oxidative stress as an early prognostic factor in acute pancreatitis (AP): Its correlation with serum phospholipase A2 (PLA2) and plasma polymorphonuclear elastase (PMN-E) in different-severity forms of human AP. *Pancreas.* 1998;17 (2):163 - 8.
- Werner J, Laposata M, Fernandez-del Castillo C, Saghir M, Iozzo RV, Lewandrowski KB, et al. Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl ester, a nonoxidative metabolite of alcohol. *Gastroenterology.* 1997;113:286-94.
- Winterbourn CC, Brennan SO. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem J.* 1997;326 ( Pt 1):87-92.
- Winterbourn CC, Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:403-9.
- Winterbourn CC, van den Berg JJ, Roitman E, Kuypers FA. Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. *Arch Biochem Biophys.* 1992;296:547-55.
- Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 1996;313 ( Pt 1):17-29.



- Woenckhaus C, Kaufmann A, Bussfeld D, Gemsa D, Sprenger H, Grone HJ. Hypochlorite-modified LDL: chemotactic potential and chemokine induction in human monocytes. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;86:27-33.
- Wong SW, Kwon MJ, Choi AM, Kim HP, Nakahira K, Hwang DH. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem*. 2009;284:27384-92.
- Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316:924-9.
- Xu P, Lou XL, Chen C, Yang ZW. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation on apoptosis in rats with acute pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2013;58:3516-23.
- Xu P, Xu K, Wang J, Jiang JP, Chen LQ. Pioglitazone: a promising therapeutic tool in sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2011;56:1082-9.
- Xu WD, Zhang M, Zhang YJ, Liu SS, Pan HF, Ye DQ. Association between leptin and systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2014;34:559-63.
- Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013;144:1252-61.
- Yamaguchi T, Nakamura H, Kihara Y, Taguchi M, Yoshikawa H, Otsuki M. Long-term overexpression of membrane type-1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in oleic acid-induced pancreatitis in rats. *Pancreas*. 2002;24:348-56.
- Yamamoto Y, Niki E, Kamiya Y. Oxidation of Lipids. I. Quantitative Determination of the Oxidation of Methyl Linoleate and Methyl Linolenate. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1982a;55:1548-50.
- Yamamoto Y, Niki E, Kamiya Y. Oxidation of lipids: III. Oxidation of methyl linoleate in solution. *Lipids*. 1982b;17:870-7.
- Yamashita A, Sugiura T, Waku K. Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *J Biochem*. 1997;122:1-16.
- Yang X, Lu X, Lombes M, Rha GB, Chi YI, Guerin TM, et al. The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab*. 2010;11:194-205.
- Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, et al. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res*. 2007;100:1442-51.
- Yeh M, Gharavi NM, Choi J, Hsieh X, Reed E, Mouillesseaux KP, et al. Oxidized phospholipids increase interleukin 8 (IL-8) synthesis by activation of the c-

- src/signal transducers and activators of transcription (STAT)3 pathway. *J Biol Chem.* 2004;279:30175-81.
- Yeop Han C, Kargi AY, Omer M, Chan CK, Wabitsch M, O'Brien KD, et al. Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation. *Diabetes.* 2010;59:386-96.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004;23:2369-80.
- Yu BL, Zhao SP, Hu JR. Cholesterol imbalance in adipocytes: a possible mechanism of adipocytes dysfunction in obesity. *Obes Rev.* 2010;11:560-7.
- Yu JH, Kim KH, Kim H. SOCS 3 and PPAR-gamma ligands inhibit the expression of IL-6 and TGF-beta1 by regulating JAK2/STAT3 signaling in pancreas. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:677-88.
- Yu M, Gao Q, Wang Y, Zhang W, Li L, Dai Y. Unbalanced omega-6/omega-3 ratio in red meat products in China. *J Biomed Res.* 2013;27:366-71.
- Yubero S, Ramudo L, Manso MA, De Dios I. Mechanisms of dexamethasone-mediated chemokine down-regulation in mild and severe acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta.* 2009a;1792:1205-11.
- Yubero S, Ramudo L, Manso MA, De Dios I. The role of redox status on chemokine expression in acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta.* 2009b;1792:148-54.
- Yubero S, Ramudo L, Manso MA, De Dios I. Targeting peripheral immune response reduces the severity of necrotizing acute pancreatitis. *Crit Care Med.* 2009c;37:240-5.
- Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, et al. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J Immunol.* 2001;167:4593-9.
- Zeyda M, Saemann MD, Stuhlmeier KM, Mascher DG, Nowotny PN, Zlabinger GJ, et al. Polyunsaturated fatty acids block dendritic cell activation and function independently of NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 2005;280:14293-301.
- Zhang Y, Cardell LO, Edvinsson L, Xu CB. MAPK/NF-kappaB-dependent upregulation of kinin receptors mediates airway hyperreactivity: a new perspective for the treatment. *Pharmacol Res.* 2013;71:9-18.
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 2004;306:1383-6.
- Zyromski NJ, Mathur A, Gowda GA, Murphy C, Swartz-Basile DA, Wade TE, et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolomics of the fatty pancreas: implicating fat in pancreatic pathology. *Pancreatology.* 2009;9:410-9.

## VIII. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS





## Acinar inflammatory response to lipid derivatives generated in necrotic fat during acute pancreatitis

A. Mateu<sup>a</sup>, L. Ramudo<sup>a</sup>, M.A. Manso<sup>a</sup>, D. Closa<sup>b</sup>, I. De Dios<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

<sup>b</sup> Department of Experimental Pathology, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 April 2014  
Received in revised form 9 June 2014  
Accepted 13 June 2014  
Available online 21 June 2014

#### Keywords:

Acinar cell  
Acute pancreatitis  
Inflammatory response  
Lipid  
Necrotic fat

### ABSTRACT

Lipids play a role in acute pancreatitis (AP) progression. We investigate the ability of pancreatic acinar cells to trigger inflammatory response in the presence of lipid compounds generated in necrotic areas of peripancreatic adipose tissue (AT) during AP induced in rats by 5% sodium taurocholate. Lipid composition of AT was analyzed by HPLC–mass spectrometry. Acinar inflammatory response to total lipids as well as to either the free fatty acid (FFA) fraction or their chlorinated products (Cl-FFAs) was evaluated. For this, mRNA expression of chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) and P-selectin as well as the activation of MAPKs, NF- $\kappa$ B and STAT-3 were analyzed in pancreatic acini. Myeloperoxidase (MPO) activity, as an inducer of Cl-FFA generation, was also analyzed in AT. MPO activity significantly increased in necrotic (AT-N) induced changes in lipid composition of necrotic fat, such as increase in FFA and phospholipid (PL) content, generation of Cl-FFAs and increases in saturated FFAs and in the poly-:mono-unsaturated FFA ratio. Total lipids from AT-N induced overexpression of CCL2 and P-selectin in pancreatic acini as well as MAPKs phosphorylation and activation of NF- $\kappa$ B and STAT3. FFAs, but not Cl-FFAs, up-regulated CCL2 and P-selectin in acinar cells. We conclude that FFAs are capable of up-regulating inflammatory mediators in pancreatic acini and given that they are highly produced during AP, mainly may contribute to the inflammatory response triggered in acinar cells by fat necrosis. No role is played by Cl-FFAs generated as a result of neutrophil infiltration.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Acute pancreatitis (AP) is an inflammatory disease whose mechanisms are extensively studied in order to find out the cause of the progression of the disease to a mild or severe form. A common feature in clinical and experimental AP is the increased plasma levels of pancreatic enzymes, lipase and phospholipase among them, as a result of the abnormal release from the damaged pancreas [1]. Furthermore, it has been reported that obesity increases the risk of developing severe AP [2] and patients with severe AP present higher amounts of fat in the abdominal area [3]. Thus, data strongly suggest that the generation of free fatty acids (FFAs) as a result of the lipolytic action of pancreatic enzymes on the neighbor adipose tissue contributes to aggravate AP. Serum FFA levels have been related to the severity of AP [4]. In fact, circulating FFAs have demonstrated to contribute to complications in the course of AP, both in the lungs and kidneys [5,6]. Locally, FFAs may also cause damage and necrosis, because of their cytotoxic [6–8] and

pro-inflammatory effects [7,9,10]. Consequently, necrosis in the abdominal adipose tissue (peripancreatic, retroperitoneal, mesenteric and omental fats) has been evidenced in severe AP [11].

A massive infiltration of neutrophils within the pancreas and peripancreatic fat occurs during AP, which is especially marked around necrotic areas [12]. These cells release myeloperoxidase (MPO), a heme protein which catalyzes a reaction between chloride and hydrogen peroxide to produce hypochlorous acid (HOCl), a potent oxidizing and chlorinating compound capable of attacking many biological molecules. HOCl easily reacts with unsaturated fatty acyl chains resulting in the formation of chlorohydrins [13]. These products could also potentially aggravate AP by inducing different deleterious effects, including destabilization of cell membrane, cytotoxicity and expression of pro-inflammatory genes [7,10,14]. Franco-Pons et al. [15] identified some chlorohydrins of fatty acids (Cl-FFAs) in necrotic areas of adipose tissue of experimental AP and demonstrated that they exert pro-inflammatory effects in peritoneal macrophages.

As pancreatic acinar cells have demonstrated to be an important source of inflammatory mediators during AP [16], our aim was to investigate the influence of lipid derivatives released from peripancreatic necrotic adipose tissue during severe AP on the inflammatory response developed by acinar cells, evaluating the role of FFAs and Cl-FFAs.

\* Corresponding author at: Departamento Fisiología y Farmacología, Edificio Departamental, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. Tel./fax: +34 923 294673.

E-mail address: [bel@usal.es](mailto:bel@usal.es) (I. De Dios).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Sodium taurocholate (NaTc), buprenorphine, hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTAB), tetramethylbenzidine (TMB), collagenase type XI, N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), amino acid mixture, bovine serum albumin (BSA), soybean trypsin inhibitor (STI), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT), digitonin, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail, Tween 20 and Nonidet P-40 were supplied by Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain). Other standard analytical grade laboratory reagents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Animals

Male Wistar rats (250–300 g body weight) were supplied by the experimental animal service of the University of Salamanca (Spain). They were housed individually in cages, maintained at  $22 \pm 1$  °C using a 12-h light/dark cycle and fed with standard laboratory chow (Teckled-Harlan 2014, Mucedola, Milan, Italy) and tap water ad libitum. The animals were fasted overnight before the experiments but they were allowed free access to water. The study was performed in accordance with European Community guidelines (2010/63/EU) and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Salamanca (Spain).

### 2.3. Experimental model of AP

Under anesthesia with 2%–3% isoflurane, Forane® (Abott, Madrid, Spain), severe AP was induced by sodium taurocholate (NaTc) according to the method of Aho and Nevalainen [17]. Briefly, after laparotomy the hepatic duct was transiently clamped at the liver hilus while 0.1 ml of a sterilized solution of 5% NaTc was retrogradely infused into the bile-pancreatic duct at a flow rate of 0.03 ml/min using a perfusion pump (Bio-Rad). The same procedure was applied to control rats but received normal saline (NaCl 0.9%) instead of NaTc. Postoperative analgesia was maintained by intramuscular injection of buprenorphine (0.2 mg/Kg).

Six hours after surgery peripancreatic adipose tissue was collected, being necrotic patches selectively chosen in rats with AP. Samples were immediately frozen and stored at  $-80$  °C until used.

### 2.4. Lipid extraction

Samples of adipose tissue of either controls or rats with AP were homogenized in phosphate-buffered solution (PBS) and lipid extraction was carried out using chloroform/methanol/water (2:2:1), according to the method of Bligh and Dyer [18]. Organic solvents were evaporated to dryness under nitrogen stream and after weighing the samples were taken up in PBS and aliquoted for: a) analysis of lipid composition, b) studies with pancreatic acini and c) obtention of the FFA fraction.

To collect the fraction containing FFAs, samples resulting from the lipid extraction were sonicated to form micelles and then incubated with lipase (3000 U/L) for 1 h at 37 °C. After evaporating to dryness they were resuspended in chloroform–acetic acid (100:1) and applied to a silica C18 reverse-phase Sep-Pak column (Waters, Milford, MA). The column was eluted with additional chloroform–acetic acid (100:1) to collect the FFA fraction. The recovery of FFA was greater than 99%.

### 2.5. Preparation of chlorohydrins of fatty acids (Cl-FFAs)

FFAs obtained from control adipose tissue were incubated with a 10-fold molar excess of sodium hypochlorite (NaOCl) at pH 6.0 for 1 h. To remove the excess of NaOCl, the incubation mixture was passed through reverse C18 phase Sep-Pak columns and eluted with chloroform:acetic acid (100:1). Standards of Cl-FFAs were obtained as

described by Winterbourn et al. [13]. Micelles of individual unsaturated FFAs (C16:1, C18:1, C18:2, C20:1, C20:4) (Sigma, Madrid, Spain) were prepared in PBS and treated with NaOCl at room temperature. The efficiency of chlorination was greater than 97%.

### 2.6. Lipid analysis by mass spectrometry

After removing the solvents, samples were re-dissolved in methanol and injected onto a High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (HPLC–MS) device, which consists of a Waters Alliance 2795 system connected to a Waters ZQ4000 (Milford, MA) operated in the either negative or positive electrospray ionization mode for FFA and Cl-FFA or phospholipid (PL) determination, respectively. Full-scan spectra from 150 to 1000 m/z were acquired. The analytical column was a 30 mm × 2.1 mm internal diameter, 2.7- $\mu$ m Ascentis express C8 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and the mobile phases were phase A: H<sub>2</sub>O/HCOOH (0.1% v/v) and phase B: acetonitrile (AcN). A linear gradient from 30% B to 100% B was run in 20 min with the column held at 30 °C. Compounds were identified on the basis of their mass measurements and quantification was achieved by external calibration according with the peak area in the chromatogram and the retention time (RT) determined by appropriate standards (Sigma). Chromatograms were constructed using Masslynx software (Waters, Milford, MA, USA).

To analyze the composition of FFA and chlorinated derivatives, the following were evaluated: FFA: 12:0 was quantified by m/z 199 (RT 8.12 min), 14:0 by m/z 227 (RT 9.45 min), 16:0 by m/z 255 (RT 10.93 min), 16:1 by m/z 253 (RT 10.01 min), 18:0 by m/z 283 (RT 12.07 min), 18:1 by m/z 281 (RT 11.15 min), 18:2 by m/z 279 (RT 10.34 min), 18:3 by m/z 277 (RT 9.79 min), 20:1 by m/z 309 (RT 12.30 min), 20:2 by m/z 307 (RT 11.53 min), 20:3 by m/z 305 (RT 10.91 min), 20:4 by m/z 303 (RT 10.35 min), 22:4 by m/z 331 (RT 11.23 min) and 22:6 by m/z 327 (RT 11.06 min).

As Cl-FFAs: 16:1 ClOH was quantified by m/z 305 (RT 7.57 min), 18:1 ClOH by m/z 333 (RT 8.82 min), 18:2 ClOH by m/z 331 (RT 8.21 min), 18:2 2ClOH by m/z 383 (RT 6.6 min), 20:1 ClOH by m/z 361 (RT 11.24 min).

PLs were grouped in three types according to the chemical structure and quantified as follows: phosphatidylcholine (PC) (RT 6.0–7.2 min), phosphatidylethanolamine (PE) (RT 7.6–8.5) and phosphatidylserine (PS) (RT 11.0–12.9 min).

All analyses were performed in the Mass Spectrometry service of the University of Salamanca (Spain).

### 2.7. Myeloperoxidase activity

Neutrophil infiltration in peripancreatic adipose tissue was estimated by measuring myeloperoxidase (MPO) activity, following a modification of the method previously described by Bhatia et al. [19]. Briefly, adipose tissue samples were resuspended in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and homogenized. After 4 cycles of freezing and thawing, the homogenates were further disrupted by sonication. Samples were incubated at 60 °C for 2 h and centrifuged afterwards at 10,000 g, for 5 min. Supernatants were collected for MPO assay by incubation with tetramethylbenzidine for 110 s at 37 °C. The reaction was stopped with 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the absorbance was measured at 450 nm.

### 2.8. Treatment of pancreatic acini

After 12 h fasting and under anesthesia with sodium pentobarbital (3 mg/100 g body weight, intraperitoneally), the pancreas of control rats was removed in order to isolate pancreatic acini by digestion with collagenase, following the method described by Gonzalez et al. [20]. Afterwards, pancreatic acini were resuspended in Na-HEPES solution (pH, 7.4) enriched with 14 mM glucose and 1% essential amino acid mixture and containing 1% (w/v) BSA, 0.01% (w/v) STI, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>

and incubated for 1 h in a 5% CO<sub>2</sub> humidified sterile atmosphere at 37 °C in the absence or presence of either lipids extracted from control adipose tissue (AT-C) or necrotic adipose tissue (AT-N), FFA fraction or CI-FFA.

### 2.9. Lactate dehydrogenase (LDH) activity

Cell viability was estimated by determining lactate dehydrogenase (LDH) activity according to the method of Gutmann and Wahlefel [21]. Released LDH was measured in the incubation medium. Residual cellular LDH was measured after lysis of pancreatic acini with a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 50 mM β-glycerophosphate, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM EDTA, 10 mM PMSF, 1 mM DTT and 150 μg/ml digitonin. Changes in absorbance due to β-nicotinamide dinucleotide formation were recorded at 339 nm at 30 °C. We computed the total LDH and calculated the LDH leakage as percentage of the total measured inside and outside cells.

### 2.10. Cytoplasmic/nuclear lysate preparation

Pancreatic acini were resuspended in ice-cold hypotonic buffer, pH 7.9 (10 mM HEPES, 2 mM EDTA, 25 mM KCl, 0.5 mM DTT) containing cocktails of inhibitors of proteases (Sigma) and phosphatases (Sigma). The mixture was kept on ice for 20 min. Then, 0.5% (v/v) Nonidet P-40 was added for 2 min, homogenized by passing through a syringe and finally centrifuged at 14,000 g for 1 min at 4 °C. The supernatant (cytosolic proteins) was removed and stored at –80 °C until use. Subsequently, the pellet was resuspended in 20 mM HEPES buffer, pH 7.9, containing 1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4.2 M NaCl, 0.5 mM DTT, and protease and phosphatase inhibitor cocktails. The mixture was kept on ice for 30 min and finally centrifuged at 14,000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant (nuclear extract) was removed and stored at –80 °C until use.

### 2.11. Western blot analysis

Cytoplasmic and nuclear extracts from pancreatic acini (30 μg) were individually separated by 12% SDS-PAGE and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. Phospho-MAPKs (p-MAPKs) were analyzed in cytoplasm and p65 and p-STAT3 in nuclear extracts. Non-specific binding was blocked by incubating the blot in Tris-buffered saline (TBS) pH 7.6, containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% (w/v) non-fat dry milk for 1 h. Afterwards, blots were incubated with the primary antibody against each of the three p-MAPKs: p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) and c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), p65 or p-STAT3 (Cell Signalling Technology, Beverly, MA) at 1:1000 dilution in TBS buffer pH 7.6, containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% (w/v) BSA overnight at 4 °C. α-tubulin and lamin B1 (load control of cytoplasmic and nuclear protein, respectively) were analyzed using respective antibodies (Cell Signalling Technology, Beverly, MA). After washing for 1 h with TBS containing 0.1% Tween 20, the blots were incubated for 1 h at room temperature with the respective horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at 1:2000 dilution in TBS buffer pH 7.6, containing 0.1% Tween 20 and 5% (w/v) nonfat dry milk and finally they were developed for visualization. The bands were detected with Phototope-HRP Detection kit (Cell Signalling Technology, Beverly, MA). Image J 1.32 software from <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html> was used to quantify the intensity of the bands. Relative protein levels were calculated compared to the either α-tubulin or lamin B1 standards. Results are expressed as fold increase vs untreated cells.

### 2.12. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from pancreatic acini using RNAeasy kit treated with amplification grade DNase 1 (Qiagen, Valencia, Spain)

according to the manufacturer's instructions. Purity of RNA was verified by ethidium bromide staining on 1% agarose gels and assessed by a 260/280 ratio. The presence of well-defined 28S and 18S rRNA bands verified the integrity of RNA.

One microgram of total RNA was reverse-transcribed to complementary DNA (cDNA) using the iScript cDNA synthesis kit for RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). cDNA was amplified by a polymerase chain reaction (PCR) on a StepOne systems (Applied Biosystems, CA, USA) using IQ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) and specific primers (Roche) for each gene: CCL2 (NM\_031530) forward: 5'-TAGCATCCACGTGCTGTCTC-3' reverse: 5'-CCGACTCATTGGGATCATCT-3'; P-selectin (NM\_013114) forward: 5'-TCTCCTGCAACGAGGAGTTT-3' reverse: 5'-GGTGTGACAGGACATTGTG-3'; 18S (NM\_046237) forward: 5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3' and reverse: 5'-GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3'. The cDNA was amplified by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 20 s. Amplifications were performed in triplicate and the melting curves were analyzed to validate product specificity. The ratio of the relative expression of target genes to 18S (internal standard) was calculated by using the ΔΔCt method. Results were expressed as fold increase over untreated cells.

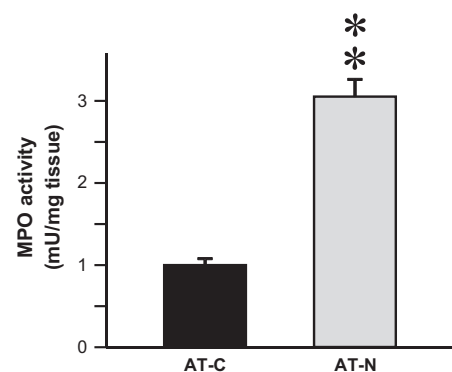
### 2.13. Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM. Statistical analysis was carried out using analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett test to evaluate significant differences among treatments. Student's *t* test was applied in experiments in which only two groups were compared. *p* values lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Myeloperoxidase (MPO) activity

MPO activity, as a measurement of neutrophil infiltration in the tissue, revealed a significant (*p* < 0.01) accumulation of neutrophils in necrotic areas of peripancreatic adipose tissue 6 h after inducing AP, reaching values three times higher than in adipose tissue of control rats (Fig. 1).



**Fig. 1.** Myeloperoxidase (MPO) activity in peripancreatic adipose tissue of control rats (AT-C) and necrotic areas of adipose tissue (AT-N) collected 6 h after inducing acute pancreatitis (AP) with 5% of sodium taurocholate. Values are means ± SEM of five animals per group (controls and AP). Student's *t* test showed significant differences (*p* < 0.01) vs control tissue.

### 3.2. Composition of adipose tissue

Analysis of lipid composition (Fig. 2) showed significant differences between control adipose tissue and necrotic fat of rats with AP. A significant ( $p < 0.01$ ) decrease in the relative abundance of triglycerides together with a significant ( $p < 0.01$ ) increase in FFA content was found in necrotic adipose tissue. Also, a significant ( $p < 0.01$ ) increase in the PL ratio was found in necrotic adipose tissue of rats with AP in comparison with control fat.

Fig. 3 depicts representative HPLC–MS chromatograms of FFAs, CI-FFAs and PLs of control and necrotic adipose tissues. The relative abundance of individual FFAs and CI-FFAs in both types of fat tissue is detailed in Table 1. Palmitic acid (16:0), the most abundant saturated FFA in adipose tissue, was found significantly ( $p < 0.01$ ) increased in necrotic adipose tissue of rats with AP. Regarding unsaturated FFAs, necrotic adipose tissue showed a decrease in monounsaturated FFAs (MUFAs) and an increase in polyunsaturated FFAs (PUFAs), which resulted in a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the PUFAs/MUFAs ratio in necrotic fat in comparison with control adipose tissue.

CI-FFAs were undetectable in control adipose tissue (Fig. 3) but they were found in necrotic adipose tissue of rats with AP, bis-chlorohydrin of linoleic acid (C18:2 2ClOH) being the most abundant (Table 2).

### 3.3. Cell viability

The measurement of LDH leakage in pancreatic acini exposed to different concentrations of lipid extract obtained from control or necrotic adipose tissue showed dose-dependent changes in cell viability (Fig. 4). Viability was maintained in values not significantly different to untreated cells when lipids from necrotic adipose tissue were used at concentrations  $\leq 2.5$  mg/ml.

### 3.4. Inflammatory response to lipids

Treatment of pancreatic acini with lipids from adipose tissue from controls or rats with AP resulted in a significant ( $p < 0.01$ ) increase in the activation of all the three MAPKs (p38, ERK and JNK) in response to samples obtained from necrotic adipose tissue, but no effect was observed in response to control lipids (Fig. 5).

As Fig. 6 shows, lipids from necrotic adipose tissue increased the activation of NF- $\kappa$ B and STAT3 transcription factors in pancreatic acini as indicated by the significant ( $p < 0.01$ ) increase in p65 and p-STAT3 found in nuclear extracts. No effect on NF- $\kappa$ B and STAT3 activation was found in response to control lipids.

Analysis of inflammatory mediators (Fig. 7) revealed that lipids obtained from necrotic patches of adipose tissue significantly increased

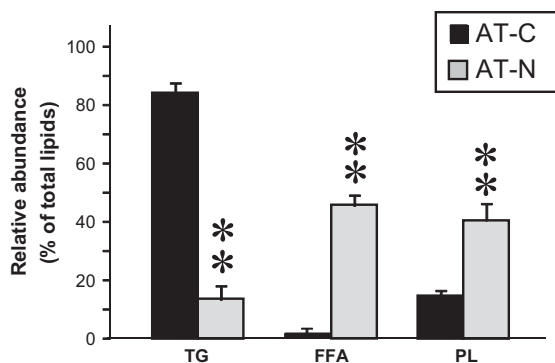


Fig. 2. Lipid composition of peripancreatic adipose tissue of control rats (AT-C) and necrotic adipose tissue (AT-N) collected 6 h after inducing acute pancreatitis with 5% of sodium taurocholate. Results are expressed as % (means  $\pm$  SEM) of the total composition (triglycerides: TGs, free fatty acids: FFAs and phospholipids: PLs). Number of samples = 4. Student's *t* test revealed significant (\*\* $p < 0.01$ ) differences vs control tissue.

the expression of CCL2 ( $p < 0.01$ ) and P-selectin ( $p < 0.05$ ) in pancreatic acini. By contrast no effect was found in response to lipids from control adipose tissue.

### 3.5. Expression of inflammatory mediators in response to FFAs and CI-FFAs

The expression of CCL2 and P-selectin was analyzed in pancreatic acini exposed to either the FFA fraction, enzymatically obtained from lipids of control adipose tissue, or CI-FFAs generated by reaction with hypochlorite reaction. As Fig. 8 shows, both CCL2 and P-selectin were significantly ( $p < 0.05$ ) overexpressed in pancreatic acini in response to either the mixture of FFAs or CI-FFAs (100  $\mu$ M and 300  $\mu$ M). No significant difference was found between FFAs and CI-FFAs when used at the same concentration.

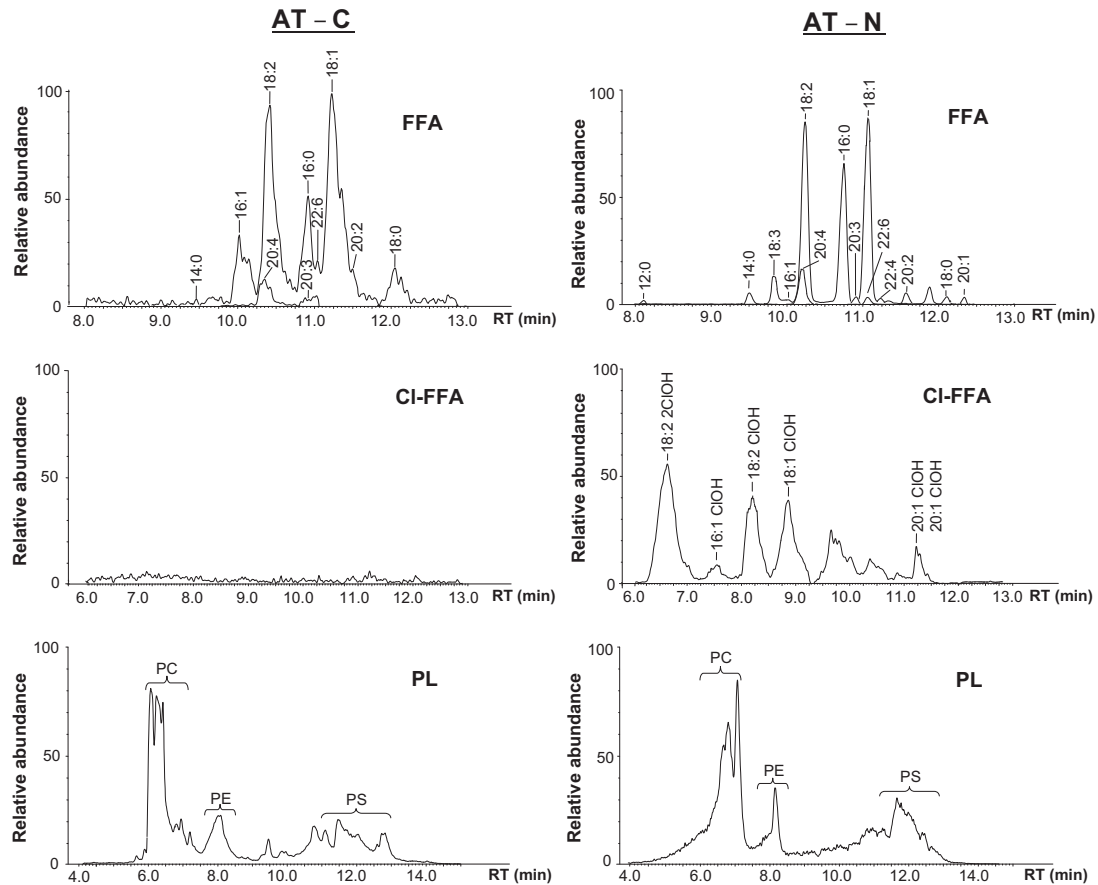
## 4. Discussion

Fat necrosis is a characteristic feature in human and experimental AP [2,22] triggered by the enzymatic action of lipase and phospholipase abnormally released through the basolateral membrane of pancreatic acinar cells from early stages of AP. Different kinds of compounds generated in necrotic adipose tissue could be responsible for developing more severe forms of AP, a hypothesis in line with the well-accepted relationship between an excess of body fat and greater AP severity [6,23]. These compounds could be accumulated in ascitic fluid and then reabsorbed to plasma. Nevertheless, as a result of metabolism, changes from the original lipid composition have been reported [15]. For this reason, lipids were extracted from necrotic areas of adipose tissue as the original source containing all lipid derivatives generated by the action of the pancreatic enzymes and the inflammatory events during AP.

Our results showed that pancreatic acinar cells, an important source of inflammatory mediators in the course of AP [16], represent a target for the lipid derivatives generated in peripancreatic fat necrosis. Sublethal concentration of lipids obtained from necrotic adipose tissue up-regulated the expression of CCL2 and P-selectin in pancreatic acini. These inflammatory factors were evaluated as representative mediators for the attraction and adhesion of leukocytes, respectively. The data suggest that by activating acinar cells to produce chemokines and adhesion molecules, lipid compounds from fat necrosis could contribute to enhancing the recruitment of circulating leukocytes toward the gland, thus exacerbating the severity of AP. Up-regulation of other key cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL1) should be expected on the basis that a similar pattern for the different mediators has been reported in response to inflammatory events [24]. Consistent with the previous studies [9,25] MAPK pathway was activated in pancreatic acini by lipids, probably due to the oxidative stress induced by FFAs [23]. In line with Navina et al.'s study [6], acinar inflammatory response to FFAs was found to be driven by NF- $\kappa$ B activation. However, the involvement of this pathway may be cell-dependent, since THP-1 macrophages line overexpressed cytokines in response to lipids from ascitic fluid of rats with AP by NF- $\kappa$ B-independent mechanisms [26]. STAT3 also showed to act as a downstream signaling pathway in the acinar inflammatory response induced by fat necrosis. The involvement of STAT3 pathway was previously demonstrated in the expression of cytokines in acinar cells isolated from the pancreas of rats with AP [26] and in acinar cells from control animals exposed to ascitic fluid of rats with AP [27], suggesting that STAT3 transcription factor is part of the regulatory mechanisms of the inflammatory response in acinar cells.

Given the different lipid composition of control and necrotic adipose tissues, it is interesting to investigate the ability of the different compounds to exert pro-inflammatory effects on pancreatic acinar cells. As expected, necrotic adipose tissue showed a significant increase in FFAs generated from triglycerides by lipolysis. In agreement with the previous studies [15], the enhanced neutrophil recruitment was evidenced in necrotic areas of peripancreatic fat 6 h after inducing AP. As a result,





**Fig. 3.** HPLC–mass spectrometric identification of free fatty acids (FFAs), chlorohydrins of fatty acids (CI-FFAs) and phospholipids (PLs) in peripancreatic adipose tissue of control rats (AT-C) and necrotic adipose tissue (AT-N) collected 6 h after inducing acute pancreatitis with 5% of sodium taurocholate. Representative chromatograms show the retention time (RT) and relative abundance (peak area) of individual FFAs (upper), CI-FFAs (middle) and PLs (bottom) grouped according to the chemical structure containing phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylserine (PS).

**Table 1**

Free fatty acids (FFAs) in the lipid fraction of control adipose tissue (AT-C) and necrotic adipose tissue (AT-N).

FFAs	AT-C	AT-N
	%	%
12:0	–	0.06 ± 0.02*
14:0	0.57 ± 0.05	0.47 ± 0.09
16:0	13.36 ± 0.13	18.75 ± 0.91**
16:1	9.38 ± 0.32	3.37 ± 0.36**
18:0	2.95 ± 0.99	4.68 ± 1.24
18:1	37.38 ± 2.23	29.54 ± 1.70*
18:2	28.04 ± 1.44	30.33 ± 1.89
18:3	–	2.78 ± 0.37**
20:1	–	0.93 ± 0.20*
20:2	1.23 ± 0.36	0.80 ± 0.24
20:3	0.77 ± 0.13	1.27 ± 0.06*
20:4	4.67 ± 0.14	4.65 ± 0.54
22:4	–	0.75 ± 0.05**
22:6	1.64 ± 0.13	1.62 ± 0.04
<b>Ratio</b>		
SFAs/UFAs	0.20 ± 0.02	0.32 ± 0.02*
PUFAs/MUFAs	0.78 ± 0.08	1.25 ± 0.13*

Values are means ± SEM of four samples. Student's *t* test revealed significant differences. SFAs: saturated fatty acids, UFAs: unsaturated fatty acids, MUFAs: mono-unsaturated fatty acids, PUFAs: poly-unsaturated fatty acids.

\* *p* < 0.05.

\*\* *p* < 0.01.

the reaction of HOCl generated by the MPO action with unsaturated FFAs produced in the same environment led to the formation of CI-FFAs, bischlorohydrin of linoleic acid being the most abundant. Although the more unsaturated FFAs are, the more likelihood for chlorination they have, no trace of chlorohydrins of arachidonic acid was found, probably due to the lability reported for this FFA in chlorination reactions [28].

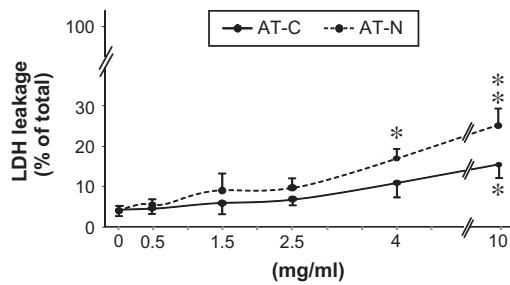
There is a broad evidence that FFAs are involved in the pathogenesis and progression of AP, but their role is not yet fully understood. Cytotoxic effects have been reported for FFAs by inducing lipid peroxidation [29], acting as detergents on cell membrane [30], inhibiting mitochondrial activity [6,10] and increasing intracellular calcium [10]. Moreover, CI-FFAs have demonstrated to be cytotoxic by disrupting the membrane lipid bilayer structure because of their high polarity [14], or depleting cellular ATP levels [31].

**Table 2**

Chlorohydrins of fatty acids (CI-FFAs) in lipids of control adipose tissue (AT-C) and necrotic adipose tissue (AT-N).

	AT-C	AT-N
CI-FFAs (nmol/mg FFA)		
16:1 1ClOH	–	0.09 ± 0.07
18:1 1ClOH	–	0.34 ± 0.09
18:2 1ClOH	–	0.23 ± 0.07
18:2 2ClOH	–	0.65 ± 0.20
20:1 1ClOH	–	0.17 ± 0.06

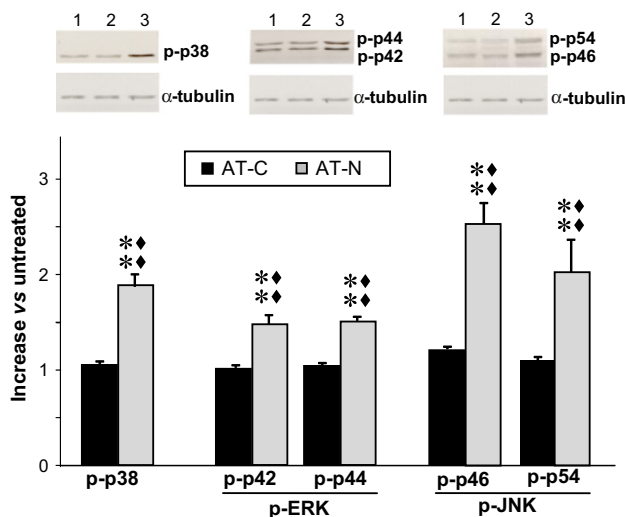
Values are means ± SEM of four samples.



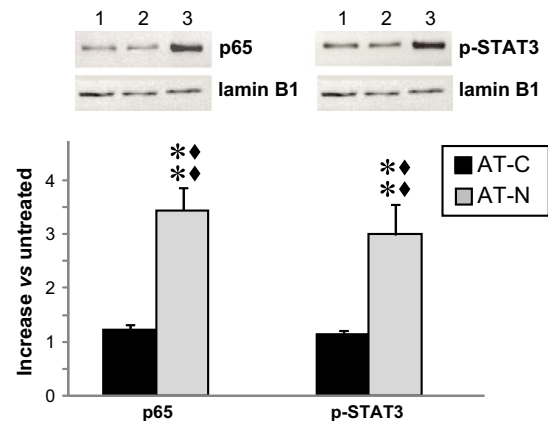
**Fig. 4.** Leakage of lactate dehydrogenase (LDH) from pancreatic acini 1 h after treatment with different concentrations of lipids obtained from peripancreatic adipose tissue of control rats (AT-C) or necrotic adipose tissue (AT-N) collected 6 h after inducing acute pancreatitis with 5% of sodium taurocholate. Results are expressed as % of the total LDH (measured inside and outside cells). Values are means  $\pm$  SEM of five experiments. ANOVA followed by Dunnett test showed significant differences vs untreated acini (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01).

We investigated the ability of FFAs and CI-FFAs to induce inflammatory response in pancreatic acinar cells. Our results evidenced that the FFA fraction up-regulated CCL2 and P-selectin mRNA expression in pancreatic acini. This result combined with the larger FFA production leads us to consider the increased FFA content in necrotic fat in the main factor responsible for exacerbating the acinar inflammatory response during AP. This finding is consistent with the notion that inhibition of lipolysis may be an appropriate therapeutic strategy to limit the local and systemic inflammatory response in AP and it would explain the beneficial effects of lipase inhibitors in the treatment of AP [6,32].

However, CI-FFAs, at concentrations in the range found in ascitic fluid of rats with AP [15], did not vary the acinar inflammatory response induced by unmodified FFAs. Different results were reported by Franco-Pons et al. [15] who observed the up-regulation of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in macrophages of control rats receiving intraperitoneal injections of CI-FFAs, suggesting a cell-dependent sensitivity to halogenated FFAs.



**Fig. 5.** Phosphorylated mitogen activated protein kinases (p-MAPKs): p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) in cytoplasmic extracts of pancreatic acini treated with lipids (2.5 mg/ml) obtained from peripancreatic adipose tissue of control rats (AT-C) or necrotic adipose tissue (AT-N) collected 6 h after inducing acute pancreatitis with 5% of sodium taurocholate. Representative Western blots are shown in upper panel: lane 1: untreated acini, lane 2: AT-C-treated acini, and lane 3: AT-N-treated acini. Relative intensity of the bands for each p-MAPK vs  $\alpha$ -tubulin (loading control) was considered. Data (means  $\pm$  SEM) are expressed as fold increase vs untreated acini. Number of experiments: 5. ANOVA followed by Dunnett test showed significant differences vs untreated acini (\*\* $p$  < 0.01) and between AT-C and AT-N ( $\blacklozenge p$  < 0.01).

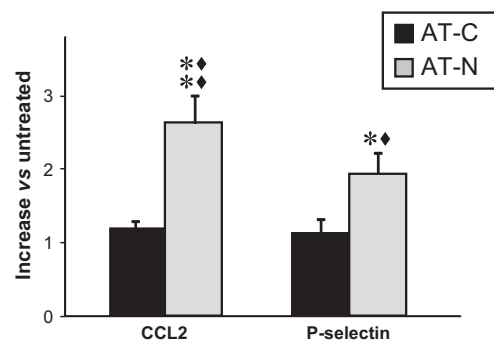


**Fig. 6.** p65 and phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3) in nuclear extracts of pancreatic acini treated with lipids (2.5 mg/ml) obtained from peripancreatic adipose tissue of control rats (AT-C) or necrotic adipose tissue (AT-N) collected 6 h after inducing acute pancreatitis with 5% of sodium taurocholate. Representative Western blots are shown in upper panel: lane 1: untreated acini, lane 2: AT-C-treated acini, and lane 3: AT-N-treated acini. Relative intensity of the bands for either p65 or p-STAT3 vs lamin B1 (loading control) was considered. Data (means  $\pm$  SEM) are expressed as fold increase vs untreated acini. Number of experiments: 5. ANOVA followed by Dunnett test showed significant differences vs untreated acini (\*\* $p$  < 0.01) and between AT-C and AT-N ( $\blacklozenge p$  < 0.01).

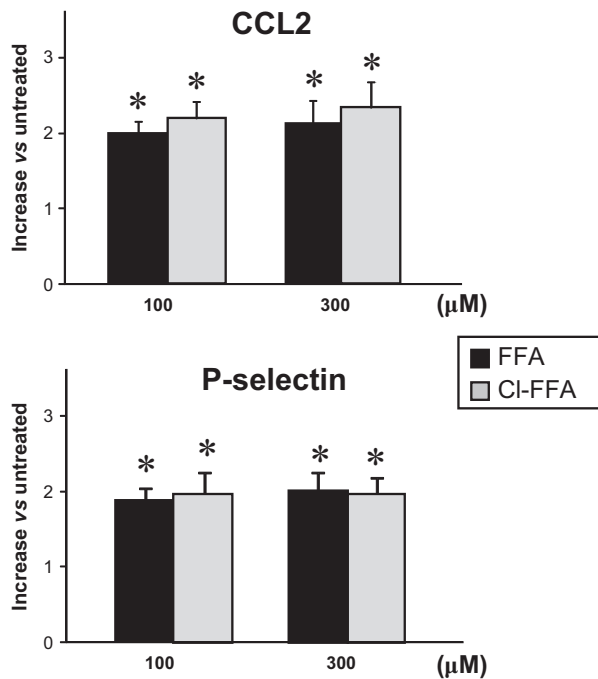
In accordance with our results, we conclude that the presence of CI-FFAs in necrotic fat would not contribute to the inflammatory response triggered by acinar cells during AP.

Both pro- and anti-inflammatory effects have been described for FFAs, depending on their chemical structure and cell type [33]. On this basis, the differences found in the FFA composition between control and necrotic adipose tissues should also be considered. The previous studies have concluded an enhancement of the inflammatory response to saturated FFAs [34–36]. In line with the pro-inflammatory effects demonstrated for palmitic acid (PA) in astrocytes [9] and macrophages [34], we suggest that the increased PA content found in necrotic fat could act as a contributing factor to the acinar inflammatory response. Anti- and pro-inflammatory effects have been reported for MUFAs [8] and PUFAs [6,10,36], respectively. Accordingly, the increased PUFAs/MUFAs ratio found in necrotic adipose tissue could also be in part the cause of the acinar inflammatory response.

Analysis of fat necrotic tissue also revealed an increase in phospholipid (PL) content, which may be the result of the adipocyte cell membrane breakdown. The cytotoxic and pro-inflammatory effects reported for PLs



**Fig. 7.** mRNA expression of CCL2 and P-selectin in pancreatic acini treated with lipids (2.5 mg/ml) obtained from peripancreatic adipose tissue of control rats (AT-C) or necrotic adipose tissue (AT-N) collected 6 h after inducing acute pancreatitis with 5% of sodium taurocholate. CCL2/18S or P-selectin/18S ratio was considered. Data (means  $\pm$  SEM) are expressed as fold increase vs untreated acini. Number of experiments: 5. ANOVA followed by Dunnett test showed significant differences vs untreated acini (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01) and between AT-C and AT-N ( $\blacklozenge p$  < 0.05,  $\blacklozenge p$  < 0.01).



**Fig. 8.** mRNA expression of CCL2 and P-selectin in pancreatic acini treated with the fraction of free fatty acids (FFAs) or chlorhydrins of FFAs (CI-FFAs). CCL2/18S or P-selectin/18S ratio was considered. Data (means  $\pm$  SEM) are expressed as fold increase vs untreated acini. Number of experiments: 5. ANOVA followed by Dunnett test showed significant differences vs untreated acini (\* $p < 0.05$ ).

in different cell types [7,37] support the hypothesis that PLs could also be involved in the inflammatory response induced by necrotic adipose tissue in acinar cells.

Future studies should be planned to investigate how the relative abundance of individual saturated and unsaturated FFAs and/or the presence of high PL content in necrotic fat may influence the inflammatory response triggered by pancreatic acinar cells during AP.

## 5. Conclusion

Our data provide evidence that lipid derivatives generated in necrotic areas of adipose tissue during AP become inducers of inflammatory response in acinar cells. FFAs up-regulated the expression of inflammatory mediators in pancreatic acini, but no additional role is played by their halogenated products, CI-FFAs, generated as a result of the massive neutrophil infiltration in necrotic fat. As FFAs are significantly increased in fat necrosis during AP, they may prove to be the main factor responsible for triggering the inflammatory response in acinar cells, although other changes in the composition of necrotic fat tissue such as the relative abundance of some of the individual FFA and the increase in PL content cannot be discarded.

## Acknowledgements

The authors thank Cesar Raposo for the excellent technical assistance in HPLC–mass spectrometric analysis. We also thank Elizabeth Nestor for her linguistic assistance. This work was supported by a grant from the University of Salamanca, Spain (USAL 13/18KAL7).

## References

[1] G. Scheele, G. Adler, H. Kern, Exocytosis occurs at the lateral plasma membrane of the pancreatic acinar cell during supramaximal secretagogue stimulation, *Gastroenterology* 92 (1987) 345–353.

[2] K.A. Porter, P.A. Banks, Obesity is a predictor of severity in acute pancreatitis, *Int. J. Pancreatol.* 10 (1991) 247–252.

[3] L. Sampere, J. Martinez, E. de Madaria, B. Lozano, J. Sánchez-Paya, R. Jover, M. Pérez Mateo, Obesity and fat distribution imply greater systemic inflammatory response and a worse prognosis in acute pancreatitis, *Pancreatology* 8 (2008) 257–264.

[4] S. Domschke, P. Malfertheiner, W. Uhl, M. Büchler, W. Domschke, Free fatty acids in serum of patients with acute necrotizing or edematous pancreatitis, *Int. J. Pancreatol.* 13 (1993) 105–110.

[5] T. Kimura, J.K. Toung, S. Margolis, W.R. Bell, J.L. Cameron, Respiratory failure in acute pancreatitis: the role of fatty acids, *Surgery* 87 (1980) 509–513.

[6] S. Navina, C. Acharya, J.P. Delany, L.S. Orlichenko, C.J. Baty, S.S. Shiva, C. Durgampudi, J.M. Karlsson, K. Lee, K.T. Bae, A. Furlan, J. Behari, S. Liu, T. McHale, L. Nichols, G.I. Papachristou, D. Yadav, V.P. Singh, Lipotoxicity causes multisystem organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 107ra110.

[7] M. Toborek, Y.W. Lee, R. Garrido, S. Kaiser, B. Henning, Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells, *Am. J. Clin. Nutr.* 75 (2002) 119–125.

[8] F. Paye, O. Presset, J. Chariot, G. Molas, C. Rozé, Role of nonesterified fatty acids in necrotizing pancreatitis: an in vivo experimental study in rats, *Pancreas* 23 (2001) 341–348.

[9] S. Gupta, A.G. Knight, J.N. Keller, A.J. Bruce-Keller, Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signalling in astrocytes, *J. Neurochem.* 120 (2012) 1060–1071.

[10] M. Toborek, S.W. Berger, M.P. Mattson, S. Barve, C.J. McClain, B. Henning, Linoleic acid and TNF- $\alpha$  cross-amplify oxidative injury and dysfunction of endothelial cells, *J. Lipid Res.* 37 (1996) 123–135.

[11] H.J. Aho, B. Sternby, T.J. Nevalainen, Fat necrosis in human acute pancreatitis, an immunohistological study, *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 94 (1988) 101–105.

[12] N. Franco-Pons, S. Gea-Sorlí, D. Closa, Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis, *J. Pathol.* 221 (2010) 175–182.

[13] C.C. Winterbourn, J.J. Van den Berg, E. Roitman, F.A. Kuypers, Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid, *Arch. Biochem. Biophys.* 296 (1992) 547–555.

[14] A.C. Carr, M.C. Vissers, N.M. Domigan, C.C. Winterbourn, Modification of red cell membrane lysis by hypochlorous acid and haemolysis by performed lipid chlorohydrins, *Redox Rep.* 3 (1997) 263–271.

[15] N. Franco-Pons, J. Casas, G. Fabriás, S. Gea-Sorlí, E. de Madaria, E. Gelpi, D. Closa, Fat necrosis generates pro-inflammatory halogenated lipids during acute pancreatitis, *Ann. Surg.* 257 (2013) 943–951.

[16] L. Ramudo, M.A. Manso, S. Sevilano, I. De Dios, Kinetic study of TNF- $\alpha$  production and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction, *J. Pathol.* 206 (2005) 9–16.

[17] H.J. Aho, T.J. Nevalainen, Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatitis lesions, *Scand. J. Gastroenterol.* 15 (1980) 417–424.

[18] E.G. Blich, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.

[19] M. Bhatia, A.K. Saluja, B. Hofbauer, J.L. Frossard, H.S. Lee, I. Castagliuolo, C.C. Wang, N. Gerard, C. Pothoulakis, M.L. Steer, Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 4760–4765.

[20] A. Gonzalez, P.J. Camello, J.A. Pariente, G.M. Salido, Free cytosolic calcium levels modify intracellular pH in rat pancreatic acini, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230 (1997) 652–656.

[21] I. Gutmann, A.W. Wahlefeld, L-(+)-lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, 1974, pp. 1464–1468.

[22] P. Schmitz-Moormann, Comparative radiological and morphological study of the human pancreas VI, acute necrotizing pancreatitis in man, *Pathol. Res. Pract.* 171 (1981) 325–335.

[23] J. Pereda, S. Pérez, J. Escobar, A. Arduini, M. Asensi, G. Serviddio, L. Sabater, L. Aparisi, J. Sastre, Obese rats exhibit high levels of fat necrosis and isoprostanes in taurocholate-induced acute pancreatitis, *Plos ONE* 7 (2012) e44383.

[24] S. Yubero, L. Ramudo, M.A. Manso, I. De Dios, Mechanisms of dexamethasone mediated chemokine down-regulation in mild and severe acute pancreatitis, *Biochem. Biophys. Acta* 1792 (2009) 1205–1211.

[25] G. Solinas, W. Naugler, F. Galini, M.S. Lee, M. Karin, Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin receptor substrates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 16454–16459.

[26] P.T. Gutierrez, E. Folch-Puy, O. Bulbena, D. Closa, Oxidised lipids present in ascitic fluid interfere with the regulation of macrophages during acute pancreatitis promoting exacerbation of the inflammatory response, *Gut* 57 (2008) 642–648.

[27] L. Ramudo, S. Yubero, M.A. Manso, S. Vicente, I. De Dios, Signal transduction of MCP-1 expression induced by pancreatitis-associated ascitic fluid in pancreatic acinar cells, *J. Cell. Mol.* 13 (2009) 1314–1320.

[28] J. Arnhold, A.N. Osipov, H. Spalteholz, O.M. Panasenka, J. Schiller, Formation of lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines under the influence of hypochlorous acid, *Biochim. Biophys. Acta* 1752 (2002) 91–100.

[29] Y. Morita, T. Yoshikawa, S. Takeda, K. Matsuyama, S. Takahashi, N. Yoshida, M.G. Clements, M. Kondo, Involvement of lipid peroxidation in free acid-induced isolated rat pancreatic acinar cell injury, *Pancreas* 17 (1998) 383–389.

[30] P.C. Lee, J.M. Howard, Fat necrosis, *Surg. Gynecol. Obstet.* 148 (1979) 785–789.

[31] G. Dever, C.L. Wainwright, S. Kennedy, C.M. Spickett, Fatty acid phospholipid chlorohydrins cause cell stress and endothelial adhesion, *Acta Biochim. Pol.* 53 (2006) 761–768.

[32] S. Gea-Sorlí, L. Bonjoch, D. Closa, Differences in the inflammatory response induced by acute pancreatitis in different white adipose tissue sites in the rat, *Plos ONE* 7 (2012) e41933.

- [33] C.M. Volpe, J.A. Nogueira-Machado, The dual role of free fatty acid signalling in inflammation and therapeutics, *Recent Patents Endocr. Metab. Inflamm. Immune Drug Discov.* 7 (2013) 189–197.
- [34] P.S. Laine, E.A. Schwartz, Y. Wang, W. Zhang, S.K. Karnik, N. Musi, P.D. Reaven, Palmitic acid induces IP-10 expression in human macrophages via NF- $\kappa$ B activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358 (2007) 150–155.
- [35] J.Y. Lee, K.H. Sohn, S.H. Rhee, D. Hwang, Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 16683–16689.
- [36] M. Valdearcos, E. Esquinas, C. Meana, L. Peña, L. Gil-de-Gomez, J. Balsinde, M.A. Balboa, Lipin-2 reduces proinflammatory signalling induced by saturated fatty acids in macrophages, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 10894–10904.
- [37] V.N. Bochkov, O.V. Oskolkova, K.G. Birukov, A.L. Levenon, C.J. Binder, J. Stöckl, Generation and biological activities of oxidized phospholipids, *Antioxid. Redox Signal.* 12 (2010) 1009–1059.



# Unsaturated but not saturated fatty acids induce transcriptional regulation of CCL2 in pancreatic acini. A potential role in acute pancreatitis

A. Mateu, I. De Dios, M.A. Manso, L. Ramudo \*

Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 8 July 2015

Received in revised form 14 September 2015

Accepted 21 September 2015

Available online 28 September 2015

### Keywords:

CCL2

Inflammation

Pancreatic acini

Saturated fatty acids

Unsaturated fatty acids

## ABSTRACT

Fatty acids (FAs) are massively released from peripancreatic fat during acute pancreatitis (AP) and they were shown, as a whole, to induce inflammatory response in pancreatic acini. We investigated the mechanisms triggered by the major saturated FAs (SFAs) and unsaturated FAs (UFAs) in modulating the expression of chemokine (C–C motif) ligand 2 (CCL2) in acinar cells. Pancreatic acini of control rats were treated with palmitic acid (PA) or stearic acid (SA), as SFAs, or oleic acid (OA) or linoleic acid (LA), as UFAs. By using specific inhibitors, the involvement of MAPKs (JNK, ERK, p38), JAK, NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways was assessed. The role of PPAR $\gamma$  pathway was studied by using 15-Deoxy- $\Delta$ (12,14)-prostaglandin J(2) (15d-PGJ2). CCL2 mRNA was analyzed by qRT-PCR. By western blot, phosphorylated forms of MAPKs and JAK as well as I $\kappa$ B- $\alpha$  were analyzed in cytoplasm and p65-NF- $\kappa$ B and phospho-STAT3 in nucleus. No effect was found in PA- or SA-treated acini. Conversely, in response to OA or LA, MAPKs and JAK acted as upstream signals, driving the CCL2 up-regulation transcriptionally mediated by the synergic action of NF- $\kappa$ B and STAT3. By blocking the activation of NF- $\kappa$ B and STAT3, 15d-PGJ2 totally inhibited the OA- and LA-induced CCL2 overexpression. We conclude that the most common UFAs, but not the SFAs, represented in peripancreatic fat and released during AP, are capable of up-regulating the acinar expression of CCL2, which depends on the activation of MAPK/JAK-mediated NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways. By targeting both transcription factors, PPAR $\gamma$  agonists could be indicated as potential therapy in AP.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Elevated concentration of free fatty acids (FAs) in plasma is a common feature in inflammatory diseases, including acute pancreatitis (AP) [1,2]. Regardless of AP etiology, digestive enzymes, such as lipases and phospholipase A2, are leaked out from the injured acinar cells into the pancreatic interstitium and blood stream [3]. As a result of the lipase action on peripancreatic adipose tissue, high amounts of FAs are generated, an event associated with multisystem organ failure during severe forms of AP [4,5] which is especially relevant in obesity. With regard to this, obesity is considered a risk factor that aggravates the progression of AP in humans [5–7] and animal models [8,9], although the underlying mechanisms are not fully understood.

*Abbreviations:* AP, acute pancreatitis; CCL2, chemokine (C–C motif) ligand 2; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FA, fatty acid; JAK, Janus kinase; JNK, Jun NH2-terminal kinase; LA, linoleic acid; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; NF- $\kappa$ B, nuclear factor-kappa B; OA, oleic acid; PA, palmitic acid; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SA, stearic acid; SFA, saturated fatty acid; STAT, signal transducer and activator of transcription; UFA, unsaturated fatty acid; 15d-PGJ2, 15-Deoxy- $\Delta$ (12,14)-prostaglandin J2.

\* Corresponding author at: Departamento Fisiología y Farmacología, Edificio Departamental, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.

E-mail address: [ramudo@usal.es](mailto:ramudo@usal.es) (L. Ramudo).

Noxious effects have been attributed to FAs due to their cytotoxic action disrupting cell membranes [10], as well as to their role in modulating inflammation [11]. Currently, there is growing interest in investigating the involvement of these lipid derivatives in diverse inflammatory disorders; however, information about the cellular mechanisms associated with the FA response is incomplete. Contradictory effects have been reported for individual FAs on different cell types. Thus, pro-inflammatory [12] and no effects [13] have been found in response to saturated FAs (SFAs). Regarding unsaturated FAs (UFAs), anti-inflammatory [14], pro-inflammatory [13,15,16] and no effects [17] have also been reported. Controversial data may be explained because the response might be cell dependent and specific for each FA according to its chemical structure. So, it is important to assess the effects exerted by individual UFAs and SFAs on the same cell type as well as the underlying mechanisms to trigger the cell response.

The effects of different lipid components on pancreatic acini have not yet been thoroughly investigated despite the relevance they may have in the pathophysiology of AP. In a recent study [18], we reported that total lipids as well as the FA fraction obtained from necrotic adipose tissue of rats with severe AP up-regulated the expression of inflammatory mediators in pancreatic acini. Given that in peripancreatic fat necrosis of rats with AP, the most abundant SFAs proved to be palmitic acid (PA, C16:0) and stearic acid (SA, C18:0), and the major UFAs

were oleic acid (OA, C18:1) and linoleic acid (LA, C18:2) [18], the aim of the current study was to assess their individual role in triggering mechanisms that lead to the inflammatory response in acinar cells. As a representative inflammatory mediator with a key role in AP, we analyzed the expression of chemokine (C–C motif) ligand 2 (CCL2) in pancreatic acini exposed to the above-mentioned FAs and the underlying signaling pathways involved in the FA response. We show that the most abundant UFAs, but not the SFAs, in necrotic peripancreatic fat tissue of rats with AP activated molecular pathways which lead to CCL2 overexpression in acinar cells. The relevance of this study lies in furthering the understanding of the role of FAs in the pathophysiology of AP and in the approach of potential therapeutic strategies to the disease.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Collagenase type XI, N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), amino acids solution, bovine serum albumin (BSA), palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, soybean trypsin inhibitor (STI), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT), digitonin, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail, Nonidet P-40, SP600125, AG-490 and 15-Deoxy- $\Delta$ (12,14)-prostaglandin J(2) (15d-PGJ2) were supplied by Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain). SB202190 was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). GDC-0994, SH-4-54 and JSH-23 were kindly donated by Selleckchem (Munich, Germany). Other standard analytical grade laboratory reagents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Animals

Male Wistar rats (250–300 g body weight) were supplied by the experimental animal service of the University of Salamanca (Spain). They were housed individually in cages, maintained at  $22 \pm 1$  °C using a 12 h light/dark cycle and fed with standard laboratory chow (Teklad-Harlan 2014, Mucedola, Milan, Italy) and tap water *ad libitum*. The animals were fasted overnight before the experiments but they were allowed free access to water. The study was performed in accordance with European Community guidelines (2010/63/EU) and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Salamanca (Spain).

### 2.3. Isolation and treatment of pancreatic acini

After 12 h fasting and under anesthesia with sodium pentobarbital (3 mg/100 g body weight, intraperitoneally), pancreas of control rats was removed in order to isolate pancreatic acini by digestion with collagenase as previously described [18]. Afterwards, pancreatic acini were resuspended in Na-HEPES solution (pH 7.4) enriched with 14 mM glucose and 1% essential aminoacid mixture and containing 1% (w/v) BSA, 0.01% (w/v) STI, and 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> and incubated (5% CO<sub>2</sub>, at 37 °C) for 1 h in the presence of the following FAs: PA (C16:0), SA (C18:0), OA (C18:1) and LA (C18:2) or the vehicle (EtOH) at concentrations  $\leq 1\%$  (controls). In some experiments, acini were pre-treated with SP600125 (50  $\mu$ M), GDC-0994 (50  $\mu$ M) or SB202190 (50  $\mu$ M), as inhibitors of JNK, ERK and p38-MAPK, respectively; AG-490 (50  $\mu$ M) as a JAK inhibitor; JSH-23 (30  $\mu$ M), SH-4-54 (10  $\mu$ M), as inhibitors of NF- $\kappa$ B and STAT3, respectively; or the vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) at concentrations  $\leq 0.3\%$ . In another set of experiments, the effect of PPAR $\gamma$  activation on the FA response was evaluated by incubating acinar cells with 15d-PGJ2 (10  $\mu$ M), a specific PPAR $\gamma$  agonist, added 5 min after initiating the incubation in the absence or presence of each FA.

### 2.4. Lactate dehydrogenase (LDH) activity

LDH leakage was evaluated as a measurement of the cell damage. LDH activity was analyzed according to the method of Gutmann and Wahlefel [19]. Cellular LDH was measured after lysis of pancreatic acini with a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 50 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM EDTA, 10 mM PMSF, 1 mM DTT and 150  $\mu$ g/ml digitonin. The released LDH was measured in the incubation medium. Changes in absorbance due to  $\beta$ -nicotinamide dinucleotide<sup>+</sup> formation were recorded at 339 nm at 30 °C. We computed the total LDH and calculated the LDH leakage as percentage of the total measured inside and outside cells.

### 2.5. Western blot analysis of MAPKs, JAK, NF- $\kappa$ B and STAT3 activation

Cytoplasmic and nuclear extracts of pancreatic acini were obtained as previously reported [18]. Samples (30  $\mu$ g) were individually separated by 12% SDS-PAGE and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. Phospho-MAPKs (p-MAPKs), phospho-JNK (p-JAK) and  $\kappa$ B- $\alpha$  were analyzed in cytoplasm and p65 and phospho-STAT3 (p-STAT3) in nuclear extracts. Non-specific binding was blocked by incubating the blot in Tris-buffered saline (TBS) pH 7.6, containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% (w/v) nonfat dry milk for 1 h. Afterwards, blots were incubated with the primary antibody against either each of the three p-MAPKs (p-JNK, p-ERK, p-p38), p-JAK,  $\kappa$ B- $\alpha$ , p65 or p-STAT3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) at 1:1000 dilution in TBS buffer pH 7.6, containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% (w/v) BSA overnight at 4 °C.  $\alpha$ -Tubulin and lamin B1 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) were used as the load control of cytoplasmic and nuclear proteins, respectively. After washing with TBS containing 0.1% Tween 20, the blots were incubated for 1 h at room temperature with the respective horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at 1:2000 dilution in TBS buffer pH 7.6, containing 0.1% Tween 20 and 5% (w/v) nonfat dry milk and finally they were developed for visualization. The bands were detected with the Phototope-HRP Detection kit (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Image J 1.32 software from <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html> was used to quantify the intensity of the bands. Relative protein levels were calculated compared to either the  $\alpha$ -tubulin or lamin B1 standards. Results are expressed as fold increase vs control acini.

### 2.6. Analysis of CCL2 mRNA by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was isolated from pancreatic acini using the RNeasy kit treated with amplification grade DNase 1 (Qiagen, Valencia, Spain) according to the manufacturer's instructions. The integrity of RNA based on the presence of well-defined 28S and 18S rRNA bands was assessed in 1% agarose gel and RNA concentration was measured by spectrometry.

For first strand cDNA synthesis, 1  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed using the iScript cDNA synthesis kit for RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). cDNA was amplified by a polymerase chain reaction (PCR) on a StepOne system (Applied Biosystems, CA, USA) using the IQ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) and specific primers (Roche) for each gene: chemokine (C–C motif) ligand 2 (CCL2) (NM\_031530) forward: 5'-TAGCATCCACGTGCTGTCTC-3' reverse: 5'-CCGACTCATTGGGATCATCT-3' and 18S (NM\_046237) forward: 5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3' and reverse: 5'-GATCCGAGGCCTCACTAAAC-3'. The cDNA was amplified by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 20 s. Amplifications were performed in triplicate and the melting curves were analyzed to validate product specificity. The ratio of the relative expression of target genes to 18S (internal standard) was calculated by using the  $\Delta\Delta$ Ct method. Results were expressed as fold increase over untreated cells.

## 2.7. Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SEM and analyzed by one-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test for multiple comparisons. Two-way ANOVA was applied in experiments in which two variables (dose and treatment) were used.  $p$  values lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Dose–response of LDH leakage and CCL2 mRNA expression

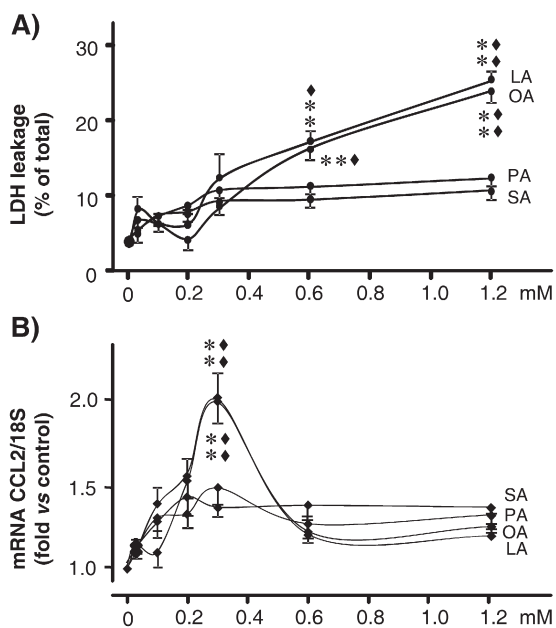
The measurement of LDH leakage (Fig. 1A) revealed no significant cell injury in pancreatic acini incubated with PA or SA at concentrations  $\leq 1200 \mu\text{M}$  in comparison with control acini. A rise in LDH leakage was found in pancreatic acini exposed to increasing concentrations of OA or LA, reaching statistical ( $p < 0.01$ ) significance at 600  $\mu\text{M}$  and 1200  $\mu\text{M}$ . Significant differences were also found between the SFAs (PA, SA) and UFAs (OA, LA) at 600  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) and 1200  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ).

The expression of acinar CCL2 mRNA in response to FAs is shown in Fig. 1B. No significant change in the acinar expression of CCL2 was found in response to either PA or SA in a range of concentrations of 0–1200  $\mu\text{M}$ . Conversely, as regards UFAs, CCL2 mRNA expression increased in response to OA or LA at 300  $\mu\text{M}$ , but it declined at lethal concentrations. Significant ( $p < 0.01$ ) differences were also found between the SFAs (PA, SA) and UFAs (OA, LA) at 300  $\mu\text{M}$ .

No significant effect was found in acini exposed to the vehicle.

### 3.2. Effects of fatty acids on the activation of MAPKs, JAK, NF- $\kappa$ B and STAT3

Activation of MAPKs (JNK, ERK and p38) and JAK was analyzed by measuring their phosphorylated forms by western blot in cytosolic extracts (Fig. 2). PA and SA did not exert significant effects on either



**Fig. 1.** Unsaturated fatty acids (UFAs), but not saturated fatty acids (SFAs), induced cell injury and CCL2 up-regulation. Pancreatic acini were incubated for 1 h in the presence of the following FAs (0–1200  $\mu\text{M}$ ): palmitic acid (PA), stearic acid (SA), oleic acid (OA), linoleic acid (LA) or EtOH, as the vehicle, (controls). A) Cell injury was measured by leakage of LDH (% of the total LDH measured inside and outside cells). B) mRNA expression of CCL2 was analyzed by qRT-PCR with 18S as internal standard. Values are means  $\pm$  SEM of five experiments. Two-way ANOVA showed significant differences vs control acini when the effect of concentration was evaluated (\*\* $p < 0.01$ ) and vs PA and SA ( $\blacklozenge p < 0.05$ ,  $\blacklozenge p < 0.01$ ) when, at each dose, the effect of the different FAs was analyzed.

MAPK or JAK activation. By contrast, significant increases in p-JNK (p54, p46), p-ERK (p44, p42), p-p38 and p-JAK were found in pancreatic acini exposed to either OA or LA.

Fig. 3 depicts data of the activation of NF- $\kappa$ B (cytosolic I $\kappa$ B- $\alpha$  and nuclear p65) and STAT3 transcription factors. No significant effect was exerted by PA or SA on NF- $\kappa$ B or STAT3 activation. In contrast, OA and LA significantly ( $p < 0.01$ ) reduced the cytosolic levels of I $\kappa$ B- $\alpha$  and significantly increased p65 at the nuclear level. Regarding STAT3 activation, OA and LA significantly ( $p < 0.01$ ) increased the nuclear p-STAT3 levels.

No change was found in response to the vehicle.

### 3.3. CCL2 mRNA up-regulation is transcriptionally regulated by NF- $\kappa$ B and STAT3

As shown in Fig. 4, the acinar CCL2 mRNA up-regulation induced by OA or LA was significantly ( $p < 0.01$ ) reduced by pre-treatment with the NF- $\kappa$ B inhibitor JSH-23 as well as with the STAT3 inhibitor SH-4-54. Nevertheless, the values obtained in acini pre-treated with the inhibitors were still found to be significantly ( $p < 0.01$ ) higher than in untreated acini.

### 3.4. Involvement of MAPKs and JAK in the NF- $\kappa$ B- and STAT3-up-regulated CCL2 mRNA expression

Fig. 5 shows the results obtained by using specific inhibitors to verify the role of MAPKs and JAK on the activation of NF- $\kappa$ B and STAT3 as well as on CCL2 mRNA up-regulation mediated by OA or LA. The densitometric analysis of I $\kappa$ B- $\alpha$  (Fig. 5A) and p65 (Fig. 5B) revealed that SP600125, GDC-0994 or SB202190, inhibitors of JNK-, ERK- and p38-MAPK, respectively, as well as AG-490, a JAK inhibitor, significantly ( $p < 0.01$ ) reduced the OA- or LA-mediated activation of NF- $\kappa$ B. The I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation induced by either OA or LA was significantly ( $p < 0.01$ ) attenuated by inhibition of either JNK, ERK, p38 or JAK. Reciprocally, the increased p65 levels found in the nucleus of pancreatic acini treated with either OA or LA were significantly ( $p < 0.01$ ) reduced by either each MAPK or JAK. Similarly, OA- or LA-induced STAT3 activation (Fig. 5C) was significantly ( $p < 0.01$ ) reduced in the presence of SP600125, GDC-0994, SB202190 or AG-490. In the same line, pre-treatment with inhibitors of either MAPKs or JAK also significantly ( $p < 0.01$ ) decreased the CCL2 mRNA up-regulation mediated by OA or LA (Fig. 5D).

Despite the presence of the inhibitors the nuclear levels of p65 and STAT3 as well as the CCL2 mRNA expression remained at values significantly higher than in untreated acini.

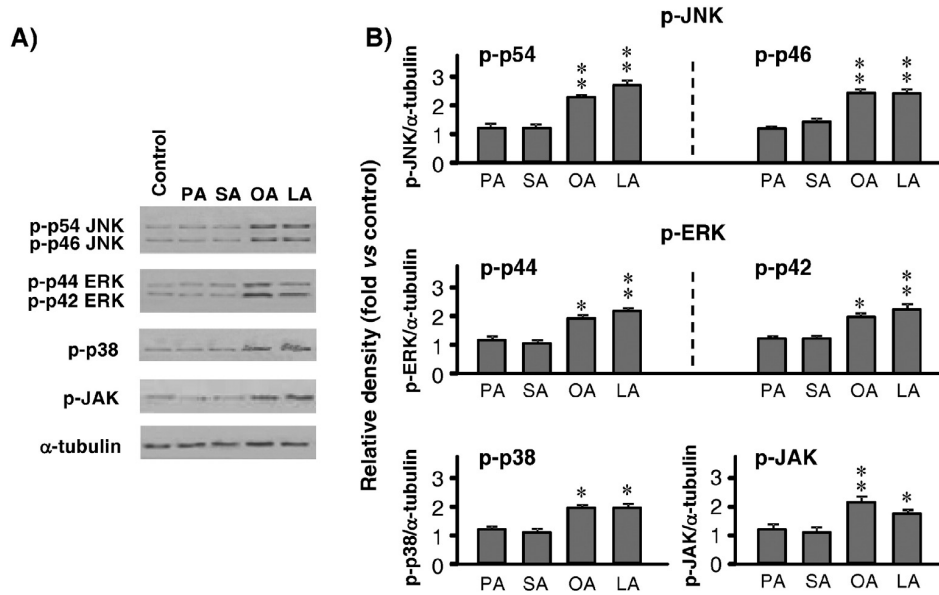
### 3.5. Effect of PPAR $\gamma$ activation on the inflammatory acinar response

As shown in Fig. 6, the presence of the PPAR $\gamma$  agonist 15d-PGJ2, in the incubation medium significantly reduced the activation of JNK-, ERK- and p38-MAPK induced by either OA or LA to values not significantly different from those of control acini. The PPAR $\gamma$  agonist also repressed the JAK activation mediated by OA or LA. No effect was exerted by 15d-PGJ2 on control acini.

As can be seen in Fig. 7A and B, 15d-PGJ2 blocked the OA- or LA-mediated NF- $\kappa$ B activation, by reducing the cytosolic I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation and p65 at the nuclear level. The PPAR $\gamma$  agonist also inhibited the STAT3 activation induced by OA or LA (Fig. 7C). Regarding CCL2 mRNA expression (Fig. 7D), 15d-PGJ2 repressed the CCL2 up-regulation induced by OA or LA.

## 4. Discussion

It is increasingly accepted that FAs play a pivotal role in modulating inflammation, but the understanding of the mechanisms involved in this response remains unclear. Given that they are released in high amounts from peripancreatic adipose tissue during AP, the assessment

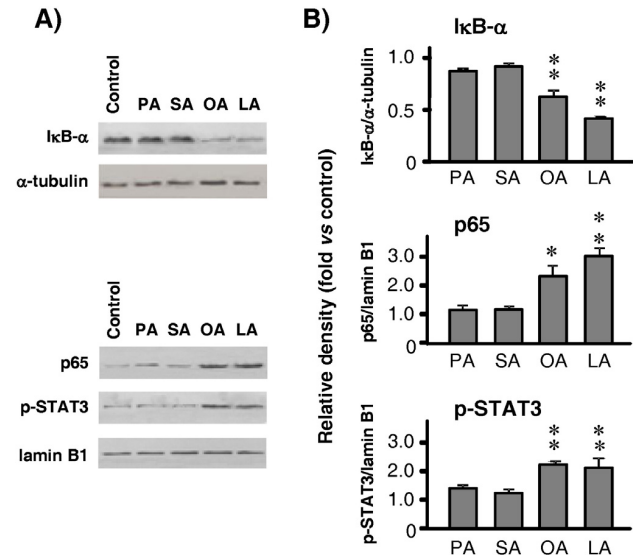


**Fig. 2.** Unsaturated fatty acids (UFAs), but not saturated fatty acids (SFAs), activated MAPKs and JAK. Pancreatic acini were incubated for 1 h in the presence of the following FAs (300 μM): palmitic acid (PA), stearic acid (SA), oleic acid (OA), linoleic acid (LA) or EtOH, as the vehicle, (controls). Phosphorylated MAPKs (p-MAPKs): c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 and phosphorylated Janus kinase (p-JAK) were analyzed in cytoplasmic extracts by western blot. Representative blots of five experiments (A) and densitometric analysis of the band intensity (B) are shown. Densities (arbitrary units) were normalized with those of α-tubulin (loading control). Results (means ± SEM) are expressed as fold increase vs control acini. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 as compared with control acini.

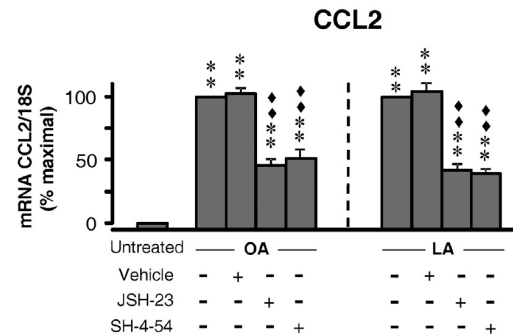
of the FA effects on acinar cells, the initial source of inflammatory mediators during the disease [20], would give new insights into the pathophysiology of AP. This proposal would be especially relevant in the context of obesity given that FAs are massively released from peripancreatic fat tissue during AP. Furthermore, obese subjects develop severe forms of the disease with abundant peripancreatic necrosis [5–9] which have proven to be enriched in UFAs [5].

Since both pro- and anti-inflammatory effects have been reported for FAs [13,15,17], knowledge of the individual effects of the major FAs in the fat tissue is of great interest considering that the specific action of each FA could determine the fate of this inflammatory disease. The use of the SFAs (PA, SA) with different number of carbon atoms and the UFAs (OA, LA) with the same carbon but different number of double bonds will allow us to ascertain whether the acinar response depends on the FA chemical structure and, in such a case, elucidate which the key molecular feature is.

In order to mechanistically explain the effects of UFAs and SFAs, we analyzed the main intracellular signaling pathways involved in the inflammatory response in acinar cells. Our data revealed that JNK-, ERK-, and p38-MAPKs as well as JAK played a key role as upstreams in the events which led to the CCL2 up-regulation mediated by the UFAs OA and LA. It is widely accepted that the phosphorylation required for the transcriptional activation of NF-κB is MAPK-dependent, while the activation of STAT3 transcription factor is generally associated with JAK

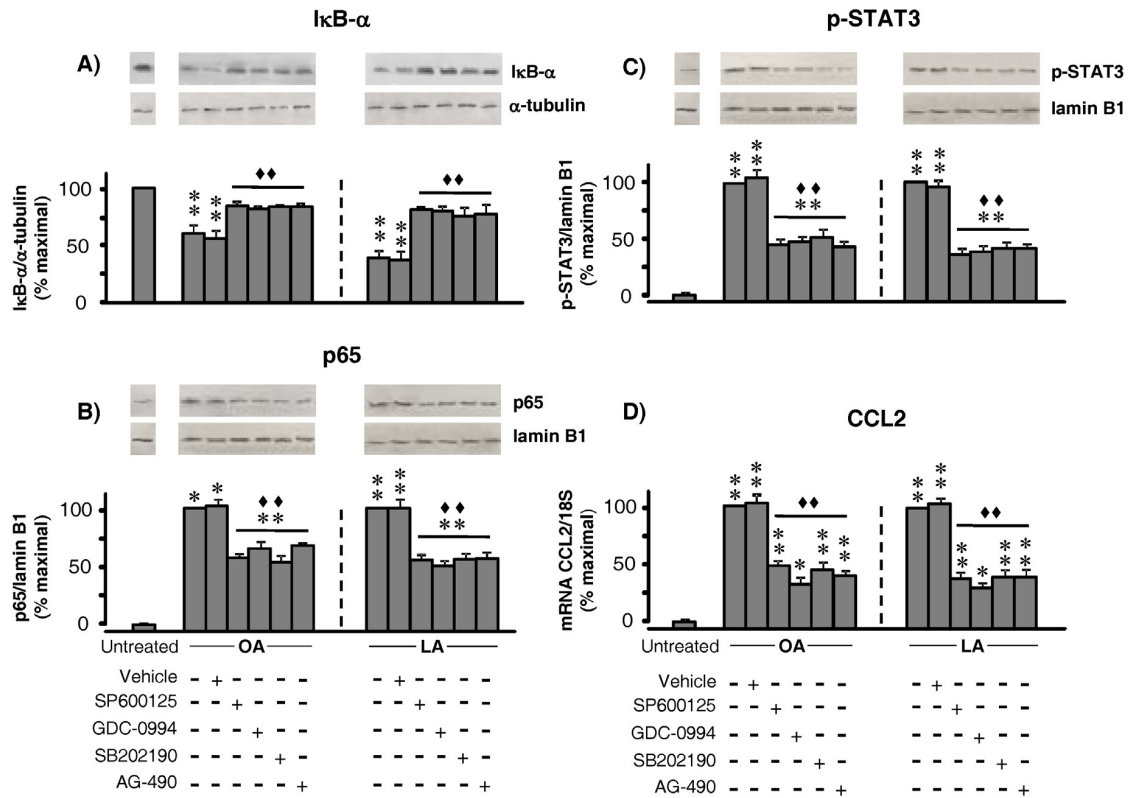


**Fig. 3.** Unsaturated fatty acids (UFAs), but not saturated fatty acids (SFAs), activated NF-κB and STAT3. Pancreatic acini were incubated for 1 h in the presence of the following FAs (300 μM): palmitic acid (PA), stearic acid (SA), oleic acid (OA), linoleic acid (LA) or EtOH, as the vehicle (controls). Western blots of cytosolic IκB-α (top), nuclear p65 (middle) and nuclear phosphorylated STAT3 (p-STAT3) (bottom) are shown. Representative blots of five experiments (A) and densitometric analysis of the band intensity (B) are shown. Densities (arbitrary units) were normalized with those of α-tubulin or lamin B1 (loading control for cytosolic or nuclear proteins, respectively). Results (means ± SEM) are expressed as fold change vs control acini. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 as compared with control acini.

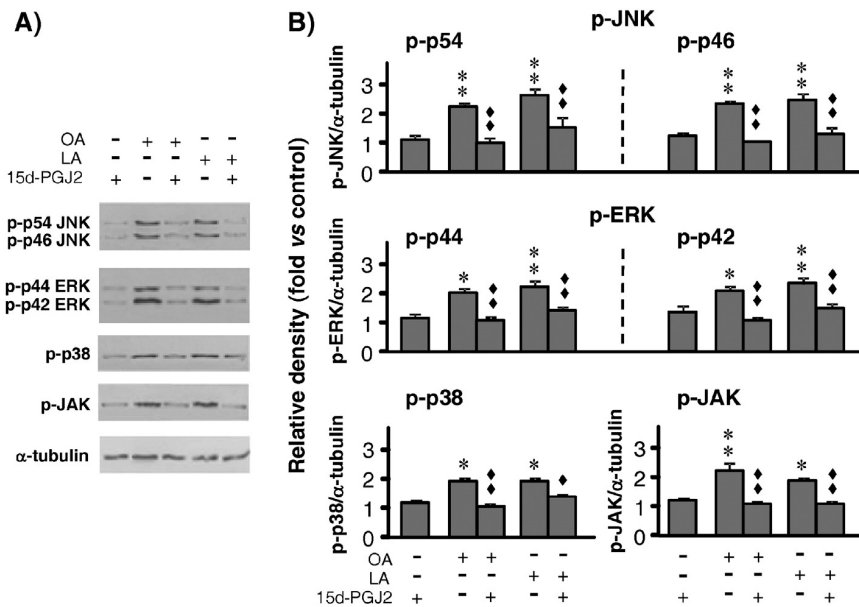


**Fig. 4.** CCL2 up-regulation induced by unsaturated fatty acids is dependent on NF-κB and STAT3. Pancreatic acini exposed for 1 h to 300 μM of oleic acid (OA) or linoleic acid (LA) were pre-treated for 45 min with the vehicle (DMSO), the NF-κB inhibitor JSH-23 (30 μM) or the STAT3 inhibitor SH-4-54 (10 μM). CCL2 mRNA expression was analyzed by qRT-PCR with 18S as internal standard. Results (means ± SEM) from five experiments are expressed as percentages of the maximal response. \*\**p* < 0.01 as compared with untreated acini, ♦♦*p* < 0.01 as compared with OA- or LA-treated acini.

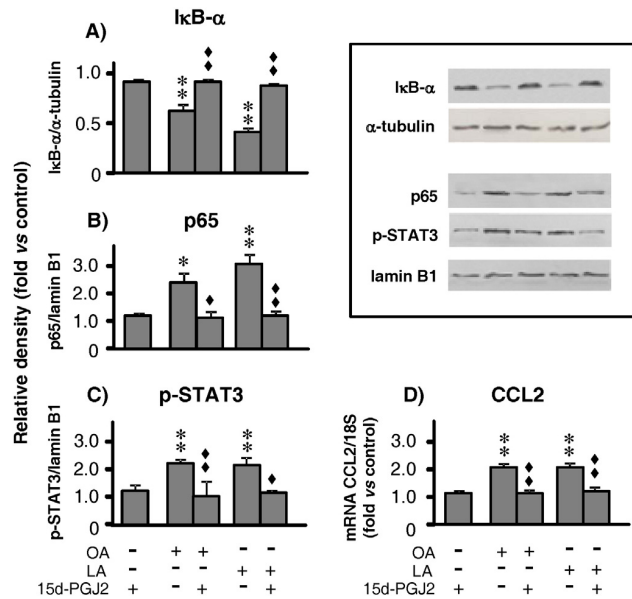




**Fig. 5.** MAPKs and JAK are upstreams of UFA-induced CCL2 up-regulation transcriptionally mediated by NF-κB and STAT3. Pancreatic acini exposed for 1 h to 300 μM of oleic acid (OA) or linoleic acid (LA) were pre-treated for 45 min with the vehicle (DMSO) or SP600125 (50 μM), GDC-0994 (50 μM) or SB202190 (50 μM), inhibitors of JNK-, ERK- and p38-MAPKs, respectively, or AG-490 (50 μM), JAK inhibitor. Levels of cytosolic IκB-α (A), nuclear p65 (B), and nuclear p-STAT3 (C) were analyzed by western-blot. Representative gels and densitometric analysis of the band intensity are shown. Densities (arbitrary units) were normalized with those of α-tubulin or lamin B1 (loading control for cytosolic or nuclear proteins, respectively). CCL2 mRNA expression (D) was analyzed by qRT-PCR with 18S as internal standard. Results (means ± SEM) from five experiments are expressed as percentages of the maximal response. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 as compared with untreated acini, ♦♦*p* < 0.01 as compared with OA- or LA-treated acini.



**Fig. 6.** 15-Deoxy-Δ(12,14)-prostaglandin J(2) (15d-PGJ2) inhibited UFA-mediated MAPKs and JAK activation. Pancreatic acini incubated for 1 h in the presence of 300 μM of the UFAs oleic acid (OA) or linoleic acid (LA) or EtOH, as the vehicle, (controls) were cultured with or without 15d-PGJ2 (10 μM). Phosphorylated MAPKs (p-MAPKs): c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 and phosphorylated Janus kinase (p-JAK) were analyzed in cytoplasmic extracts by western blot. Representative gels of five experiments (A) and densitometric analysis of the band intensity (B) are shown. Densities (arbitrary units) were normalized with those of α-tubulin (loading control). Results (means ± SEM) are expressed as fold changes vs control acini. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 as compared with control acini, ♦*p* < 0.05, ♦♦*p* < 0.01 as compared with OA- or LA-treated acini.



**Fig. 7.** 15-Deoxy- $\Delta(12,14)$ -prostaglandin J(2) (15d-PGJ2) suppressed UFA-induced CCL2 up-regulation via inhibition of NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways. Pancreatic acini incubated for 1 h in the presence of 300  $\mu$ M of the UFAs oleic acid (OA) or linoleic acid (LA) or EtOH, as the vehicle, (controls), were cultured with or without 15d-PGJ2 (10  $\mu$ M). Representative western blots of five experiments and densitometric analysis of the band intensity of cytosolic I $\kappa$ B- $\alpha$  (A), nuclear p65 (B) and nuclear p-STAT3 (C) are shown. Densities (arbitrary units) were normalized with those of  $\alpha$ -tubulin or lamin B1 (loading control for cytosolic or nuclear proteins, respectively). CCL2 mRNA expression (D) was analyzed by qRT-PCR with 18S as internal standard. Results (means  $\pm$  SEM) are expressed as fold changes vs control acini. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 as compared with control acini,  $\blacklozenge$   $p$  < 0.05,  $\blacklozenge$   $p$  < 0.01 as compared with OA- or LA-treated acini.

phosphorylation [21,22]. However, the use of specific inhibitors for each kinase in the current study indicated that MAPKs as well as JAK are involved in the UFA-mediated activation of both NF- $\kappa$ B and STAT3 transcription factors.

The individual inhibition of these kinases did not totally repress the CCL2 overexpression induced by either OA or LA, suggesting that JNK-, p38- and ERK-MAPK and JAK must act in a synergic way on the mechanisms that converge in the CCL2 expression. In addition, the selective inhibition of NF- $\kappa$ B and STAT3 activation provides evidence that both transcription factors contribute to up-regulate mRNA CCL2 expression in acinar cells stimulated by OA or LA. In line with our results, the involvement of NF- $\kappa$ B in the FA-induced expression of pro-inflammatory genes has also been reported in other endothelial cells [15,23,24] and adipocytes [25]. However, NF- $\kappa$ B non-dependent mechanisms have also been demonstrated to mediate inflammatory response in dendritic cells [26] and macrophages [27].

Regarding the STAT3 signal, the current study reinforces the previously reported notion of the involvement of this pathway in the acinar inflammatory response to lipid components of necrotic adipose tissue of rats with severe AP [18]. Also, STAT3 activation has demonstrated to be involved in the inflammatory response of acinar cells during AP [28,29]. Taken together, this indicates that in addition to NF- $\kappa$ B and AP-1 [20,30,31], the transcriptional activity of STAT3 might be key in the signaling mechanisms that lead to the expression of inflammatory mediators in acinar cells exposed to stressful conditions.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a family of ligand-inducible transcription factors involved in the lipid-associated inflammatory response [11]. PPAR $\gamma$  has been found to be highly expressed in pancreatic AR42J cells [32] and pancreatic tissue [33]. By acting as PPAR $\gamma$  ligands, n-3 PUFAs exerted suppressive effects on inflammatory response [34]. Conversely, the pro-inflammatory effects induced on macrophages by FAs proved to be the result of interference in

the PPAR $\gamma$  anti-inflammatory activity [27]. This interference might be discarded in pancreatic acinar cells since the activation of the PPAR $\gamma$  pathway by adding 15d-PGJ2 in the presence of OA or LA resulted in the total inhibition of the UFA-mediated CCL2 up-regulation. In accordance with this result, PPAR $\gamma$  might not be considered to play a role in the acinar inflammatory response mediated by UFAs. However, the use of 15d-PGJ2, the most specific PPAR $\gamma$  agonist [35], allowed us to elucidate the signaling mechanisms triggered by the PPAR $\gamma$  pathway to inhibit the UFA-mediated CCL2 overexpression in pancreatic acini. Our data showed that PPAR $\gamma$  activation prevented the phosphorylation of MAPKs and JAK and hence the subsequent NF- $\kappa$ B and STAT3 activation. Consistent with our results, blockage of NF- $\kappa$ B [36] and STAT3 [37] activation has also been reported in cerulein-stimulated pancreatic AR42J cells pre-treated with 15d-PGJ2. The current data reinforce the notion that the use of PPAR $\gamma$  agonists might be considered as a potential therapeutic strategy for reducing inflammation during AP [38–40].

In line with our results, CCL2 overexpression in response to LA has been reported in different cell types [15,41,42], including acinar cells [13]. However, pro-inflammatory [16], anti-inflammatory [15] and no effects [17] have been described for OA. The pro-inflammatory action of OA found in the current study could be the basis to explain the etiopathology of AP experimentally induced in rats by retrograde perfusion of oleic acid into the pancreatic duct [43,44], such that the CCL2 up-regulation induced by OA in acinar cells might be the signal to attract circulating leukocytes to the gland and trigger severe forms of AP.

Hawkins et al. [45] reported that the lipid peroxidation and death of pancreatic acinar cells in response to FAs are related to the number of double bonds in the molecule. This finding led us in a recent study [18] to suggest that increases in PUFA/MUFA ratio found in necrotic adipose tissue of rats with severe AP could be responsible for the acinar inflammatory response induced by the total free FAs. Data shown in the current study leads us to dismiss this hypothesis since the CCL2 expression in acinar cells exposed to effective doses of either OA or LA proved to be similar.

Regarding the SFA effects, our study showed that both SA and PA failed to trigger inflammatory response in acinar cells. In line with previous studies [13,46,47], our findings corroborate the notion that the unsaturated state of FAs determines the injury and the inflammatory response in pancreatic acinar cells. Taken the UFA and SFA data together, our study provides evidence that the presence of bonds in the FA molecule, but not the number of double bonds nor the length of the chain, is the feature that determines the triggering of mechanisms required for the development of the inflammatory response in pancreatic acinar cells.

Our results suggest that UFAs would play a key role in AP such that they could be the link between obesity and a worse AP outcome. This notion is supported by a highly pertinent study by Noel et al. [5] who reported that UFAs, found in high concentrations in necrotic collections from obese patients with AP, are responsible not only for acinar necrosis, but also for triggering multisystem organ failure by mechanisms non-dependent on pancreatic necrosis. All these findings reinforce the notion that treatments preventing the generation of UFAs could have beneficial effects in severe AP.

## 5. Conclusion

This study contributes new information about the cellular mechanisms by which FAs exert differential effects on the inflammatory response triggered in pancreatic acinar cells depending on the unsaturation state. Our data provide mechanistic evidence that the most abundant UFAs, but not the major SFAs, in peripancreatic fat and released during AP, could play a role in the pathophysiology of AP. They are capable of up-regulating the acinar expression of CCL2 through the activation of MAPK/JAK-mediated NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways. By targeting both transcription factors, the use of PPAR $\gamma$  agonists could be indicated as potential therapy in AP.

## Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

## Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

## Acknowledgments

Thanks are due to Elizabeth Nestor for her linguistic assistance. This work was supported by grants from the Junta Castilla-León, Spain (BIO/SAG63/14) and the University of Salamanca, Spain (USAL 13/18KAL7).

## References

- S. Domschke, P. Malfertheiner, W. Uhl, M. Buchler, W. Domschke, Free fatty acids in serum of patients with acute necrotizing or edematous pancreatitis, *Int. J. Pancreatol.* 13 (1993) 105–110.
- D. Estadella, C.M. Dapenhaolerdonascimento, L.M. Oyama, E.B. Ribeiro, A.R. Damaso, A. de Piano, Lipotoxicity: effects of dietary saturated and trans fatty acids, *Mediat. Inflamm.* (2013) 137579.
- G.H. Sakorafas, A.G. Tsiotou, Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts, *J. Clin. Gastroenterol.* 30 (2000) 343–356.
- K. Sztetko, J. Panek, Serum free fatty acid concentration in patients with acute pancreatitis, *Pancreatol.* 1 (2001) 230–236.
- P. Noel, K. Patel, C. Durgampudi, R.N. Trivedi, C. de Oliveira, M.D. Crowell, R. Pannala, K. Lee, R. Brand, J. Chennat, A. Slivka, G.I. Papachristou, A. Khalid, D.C. Whitcomb, J.P. DeLany, R.A. Cline, C. Acharya, D. Jalgama, F.M. Murad, D. Yadav, S. Navina, V.P. Singh, Peripancreatic fat necrosis worsens acute pancreatitis independent of pancreatic necrosis via unsaturated fatty acids increased in human pancreatic necrosis collections, *Gut* (2014).
- L. Sempere, J. Martinez, E. de Madaria, B. Lozano, J. Sanchez-Paya, R. Jover, M. Perez-Mateo, Obesity and fat distribution imply a greater systemic inflammatory response and a worse prognosis in acute pancreatitis, *Pancreatol.* 8 (2008) 257–264.
- G.I. Papachristou, D.J. Papachristou, H. Avula, A. Slivka, D.C. Whitcomb, Obesity increases the severity of acute pancreatitis: performance of APACHE-O score and correlation with the inflammatory response, *Pancreatol.* 6 (2006) 279–285.
- H.H. Al-Azzawi, T.E. Wade, D.A. Swartz-Basile, S. Wang, H.A. Pitt, N.J. Zyromski, Acute pancreatitis in obesity: adipokines and dietary fish oil, *Dig. Dis. Sci.* 56 (2011) 2318–2325.
- R. Segersvard, M. Sylvan, M. Herrington, J. Larsson, J. Permert, Obesity increases the severity of acute experimental pancreatitis in the rat, *Scand. J. Gastroenterol.* 36 (2001) 658–663.
- Y. Morita, T. Yoshikawa, S. Takeda, K. Matsuyama, S. Takahashi, N. Yoshida, M.G. Clemens, M. Kondo, Involvement of lipid peroxidation in free fatty acid-induced isolated rat pancreatic acinar cell injury, *Pancreas* 17 (1998) 383–389.
- C.M. Volpe, J.A. Nogueira-Machado, The dual role of free fatty acid signaling in inflammation and therapeutics, *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug. Discov.* 7 (2013) 189–197.
- C.M. Oller do Nascimento, E.B. Ribeiro, L.M. Oyama, Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat, *An. Acad. Bras. Cienc.* 81 (2009) 453–466.
- S. Navina, C. Acharya, J.P. DeLany, L.S. Orlichenko, C.J. Baty, S.S. Shiva, C. Durgampudi, J.M. Karlsson, K. Lee, K.T. Bae, A. Furlan, J. Behari, S. Liu, T. McHale, L. Nichols, G.I. Papachristou, D. Yadav, V.P. Singh, Lipotoxicity causes multisystem organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 107ra110.
- P.C. Calder, n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases, *Am. J. Clin. Nutr.* 83 (2006) 1505S–1519S.
- M. Toborek, Y.W. Lee, R. Garrido, S. Kaiser, B. Hennig, Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells, *Am. J. Clin. Nutr.* 75 (2002) 119–125.
- I.M. Fang, C.H. Yang, C.M. Yang, M.S. Chen, Comparative effects of fatty acids on pro-inflammatory gene cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in retinal pigment epithelial cells, *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) 739–750.
- S. Gupta, A.G. Knight, S. Gupta, J.N. Keller, A.J. Bruce-Keller, Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes, *J. Neurochem.* 120 (2012) 1060–1071.
- A. Mateu, L. Ramudo, M.A. Manso, D. Closa, I. De Dios, Acinar inflammatory response to lipid derivatives generated in necrotic fat during acute pancreatitis, *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (2014) 1879–1886.
- I. Gutmann, A.W. Wahlefel, L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York 1974, pp. 1464–1468.
- L. Ramudo, M.A. Manso, S. Seviliano, I. de Dios, Kinetic study of TNF- $\alpha$  production and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction, *J. Pathol.* 206 (2005) 9–16.
- P.C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Muller-Newen, F. Schaper, Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *Biochem. J.* 374 (2003) 1–20.
- Y. Zhang, L.O. Cardell, L. Edvinsson, C.B. Xu, MAPK/NF- $\kappa$ B-dependent upregulation of kinin receptors mediates airway hyperreactivity: a new perspective for the treatment, *Pharmacol. Res.* 71 (2013) 9–18.
- B. Hennig, M. Toborek, S. Joshi-Barve, S.W. Barger, S. Barve, M.P. Mattson, C.J. McClain, Linoleic acid activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and induces NF- $\kappa$ B-dependent transcription in cultured endothelial cells, *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 322–328.
- B. Hennig, W. Lei, X. Arzuaga, D.D. Ghosh, V. Saraswathi, M. Toborek, Linoleic acid induces proinflammatory events in vascular endothelial cells via activation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling, *J. Nutr. Biochem.* 17 (2006) 766–772.
- N. Siriwardhana, N.S. Kalupahana, S. Fletcher, W. Xin, K.J. Claycombe, A. Quignard-Boulangé, L. Zhao, A.M. Saxton, N. Moustaid-Moussa, n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids differentially regulate adipose angiotensinogen and other inflammatory adipokines in part via NF- $\kappa$ B-dependent mechanisms, *J. Nutr. Biochem.* 23 (2012) 1661–1667.
- M. Zeyda, M.D. Saemann, K.M. Stuhlmeier, D.G. Mascher, P.N. Nowotny, G.J. Zlabinger, W. Waldhausl, T.M. Stulnig, Polyunsaturated fatty acids block dendritic cell activation and function independently of NF- $\kappa$ B activation, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 14293–14301.
- P.T. Gutierrez, E. Folch-Puy, O. Bulbena, D. Closa, Oxidised lipids present in ascitic fluid interfere with the regulation of the macrophages during acute pancreatitis, promoting an exacerbation of the inflammatory response, *Gut* 57 (2008) 642–648.
- S. Yubero, L. Ramudo, M.A. Manso, I. De Dios, The role of redox status on chemokine expression in acute pancreatitis, *Biochim. Biophys. Acta* 1792 (2009) 148–154.
- S. Yubero, L. Ramudo, M.A. Manso, I. De Dios, Mechanisms of dexamethasone-mediated chemokine down-regulation in mild and severe acute pancreatitis, *Biochim. Biophys. Acta* 1792 (2009) 1205–1211.
- L. Ramudo, S. Yubero, M.A. Manso, S. Vicente, I. De Dios, Signal transduction of MCP-1 expression induced by pancreatitis-associated ascitic fluid in pancreatic acinar cells, *J. Cell. Mol. Med.* 13 (2009) 1314–1320.
- L.S. Orlichenko, J. Behari, T.H. Yeh, S. Liu, D.B. Stolz, A.K. Saluja, V.P. Singh, Transcriptional regulation of CXCL12 chemokines KC and MIP-2 in mouse pancreatic acini, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299 (2010) G867–G876.
- A. Masamune, K. Satoh, Y. Sakai, M. Yoshida, A. Satoh, T. Shimosegawa, Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  induce apoptosis in AR42J cells, *Pancreas* 24 (2002) 130–138.
- P. Xu, X.L. Lou, C. Chen, Z.W. Yang, Effects of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation on apoptosis in rats with acute pancreatitis, *Dig. Dis. Sci.* 58 (2013) 3516–3523.
- G. Schmitz, J. Ecker, The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids, *Prog. Lipid Res.* 47 (2008) 147–155.
- B.M. Forman, P. Tontonoz, J. Chen, R.P. Brun, B.M. Spiegelman, R.M. Evans, 15-Deoxy- $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J<sub>2</sub> is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR  $\gamma$ , *Cell* 83 (1995) 803–812.
- H. Wan, Y. Yuan, A. Qian, Y. Sun, M. Qiao, Pioglitazone, a PPAR $\gamma$  ligand, suppresses NF $\kappa$ B activation through inhibition of I $\kappa$ B kinase activation in cerulein-treated AR42J cells, *Biomed. Pharmacother.* 62 (2008) 466–472.
- J.H. Yu, K.H. Kim, H. Kim, SOCS 3 and PPAR- $\gamma$  ligands inhibit the expression of IL-6 and TGF- $\beta$ 1 by regulating JAK2/STAT3 signaling in pancreas, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 677–688.
- K. Hashimoto, R.T. Ethridge, H. Saito, S. Rajaraman, B.M. Evers, The PPAR $\gamma$  ligand, 15d-PGJ<sub>2</sub>, attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis, *Pancreas* 27 (2003) 58–66.
- S. Cuzzocrea, B. Pisano, L. Dugo, A. Ianaro, D. Britti, N.S. Patel, R. Di Paola, T. Genovese, M. Di Rosa, A.P. Caputi, C. Thiemermann, Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , reduces acute pancreatitis induced by cerulein, *Intensive Care Med.* 30 (2004) 951–956.
- P. Xu, K. Xu, J. Wang, J.P. Jiang, L.Q. Chen, Pioglitazone: a promising therapeutic tool in sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis, *Dig. Dis. Sci.* 56 (2011) 1082–1089.
- Y.F. Jiang, M.I. Vaccaro, F. Fiedler, E.L. Calvo, J.L. Iovanna, Lipopolysaccharides induce p8 mRNA expression in vivo and in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260 (1999) 686–690.
- M.T. Nguyen, A. Chen, W.J. Lu, W. Fan, P.P. Li, D.Y. Oh, D. Patsouris, Regulation of chemokine and chemokine receptor expression by PPAR $\gamma$  in adipocytes and macrophages, *PLoS One* 7 (2012), e34976.
- T. Yamaguchi, H. Nakamura, Y. Kihara, M. Taguchi, H. Yoshikawa, M. Otsuki, Long-term overexpression of membrane type-1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in oleic acid-induced pancreatitis in rats, *Pancreas* 24 (2002) 348–356.
- M. Tashiro, H. Nakamura, M. Taguchi, T. Yamaguchi, H. Yoshikawa, K. Fukumitsu, Y. Kihara, M. Otsuki, Oleic acid-induced pancreatitis alters expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 and extracellular matrix components in rats, *Pancreas* 26 (2003) 197–204.
- R.A. Hawkins, K. Sangster, M.J. Arends, Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism, *J. Pathol.* 185 (1998) 61–70.
- J. Mossner, H. Bodeker, W. Kimura, F. Meyer, S. Bohm, W. Fischbach, Isolated rat pancreatic acini as a model to study the potential role of lipase in the pathogenesis of acinar cell destruction, *Int. J. Pancreatol.* 12 (1992) 285–296.
- D.N. Criddle, J. Murphy, G. Fistetto, S. Barrow, A.V. Tepikin, J.P. Neoptolemos, R. Sutton, O.H. Petersen, Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis, *Gastroenterology* 130 (2006) 781–793.





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biocel](http://www.elsevier.com/locate/biocel)

## Cross-talk between TLR4 and PPAR $\gamma$ pathways in the arachidonic acid-induced inflammatory response in pancreatic acini

A. Mateu, L. Ramudo, M.A. Manso, I. De Dios\*

Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, Edificio Departamental Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 7 July 2015

Received in revised form

21 September 2015

Accepted 22 October 2015

Available online 25 October 2015

## Keywords:

Arachidonic acid

Acute pancreatitis

Pancreatic acini

TLR4

PPAR $\gamma$ 

Inflammatory gene expression

## ABSTRACT

Arachidonic acid (AA) is generally associated with inflammation in different settings. We assess the molecular mechanisms involved in the inflammatory response exerted by AA on pancreatic acini as an approach to acute pancreatitis (AP). Celecoxib (COX-2 inhibitor), TAK-242 (TLR4 inhibitor) and 15d-PGJ2 (PPAR $\gamma$  agonist) were used to ascertain the signaling pathways. In addition, we examine the effects of TAK-242 and 15d-PGJ2 on AP induced in rats by bile-pancreatic duct obstruction (BPDO). To carry out *in vitro* studies, acini were isolated from pancreas of control rats. Generation of PGE2 and TXB2, activation of pro-inflammatory pathways (MAPKs, NF- $\kappa$ B, and JAK/STAT3) and overexpression of CCL2 and P-selectin was found in AA-treated acini. In addition, AA up-regulated TLR4 and down-regulated PPAR $\gamma$  expression. Celecoxib prevented the up-regulation of CCL2 and P-selectin but did not show any effect on the AA-mediated changes in TLR4 and PPAR $\gamma$  expression. TAK-242, reduced the generation of AA metabolites and repressed both the cascade of pro-inflammatory events which led to CCL2 and P-selectin overexpression as well as the AA-induced PPAR $\gamma$  down-regulation. Thus, TLR4 acts as upstream activating pro-inflammatory and inhibiting anti-inflammatory pathways. 15d-PGJ2 down-regulated TLR4 expression and hence prevented the synthesis of AA metabolites and the inflammatory response mediated by them. Reciprocal negative cross-talk between TLR4 and PPAR $\gamma$  pathways is evidenced. *In vivo* experiments showed that TAK-242 and 15d-PGJ2 treatments reduced the inflammatory response in BPDO-induced AP. We conclude that through TLR4-dependent mechanisms, AA up-regulated CCL2 and P-selectin in pancreatic acini, partly mediated by the generation of PGE2 and TXB2, which activated pro-inflammatory pathways, but also directly by down-regulating PPAR $\gamma$  expression with anti-inflammatory activity. *In vitro* and *in vivo* studies support the role of TLR4 in AP and the use of TLR4 inhibitors and PPAR $\gamma$  agonists in AP treatment.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Pancreatic acinar cells have demonstrated to be able to produce inflammatory mediators at early stages of acute pancreatitis (AP) (Yubero et al., 2009a, 2009b). Among other factors, fatty acids (FAs) released from peripancreatic adipose tissue during AP have demonstrated to play a key role to trigger the acinar inflammatory response (Mateu et al., 2014).

**Abbreviations:** AA, arachidonic acid; BPDO, bile-pancreatic duct obstruction; CCL2, chemokine (C-C motif) ligand 2; COX-2, Cyclooxygenase-2; FA, fatty acid; JAK, janus kinase; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; NF- $\kappa$ B, nuclear factor-kappa B; PGE2, prostaglandin E2; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; STAT, signal transducer and activator of transcription; TLR, Toll-like receptor; TXB2, thromboxane 2; 15d-PGJ2, 15-Deoxy- $\Delta$ (12,14)-prostaglandin J2.

\* Corresponding author. Tel.: +34 923294673; fax: +34 923 294673.

E-mail address: [bel@usal.es](mailto:bel@usal.es) (I. De Dios).

Arachidonic acid (AA) is a type n-6 polyunsaturated FA highly represented in the composition of phospholipids in the membrane of inflammatory cells (Irvine, 1982). It is the precursor of eicosanoids, such as prostaglandin E<sub>2</sub>, thromboxanes and leukotrienes, which are long-recognized mediators of inflammation (Khanapure et al., 2007), and whose levels in plasma have been found increased in inflammatory diseases, AP included (Zhang et al., 2009). However, little information has been reported regarding the effects that AA might exert on the signaling pathways involved in the inflammatory response when it is present in high quantities in the cell microenvironment.

Toll-like receptors (TLRs) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) have demonstrated to act as molecular targets of FAs in different inflammatory settings (Lee et al., 2001; Valdearcos et al., 2012; Volpe and Nogueira-Machado, 2013; Weatherill et al., 2005; Wong et al., 2009). The involvement of both pathways, with opposite effects, in the response to AA has not yet been examined.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.10.022>

1357-2725/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

TLRs are a family of transmembrane proteins which act as key receptors involved in inflammatory responses (Akira and Takeda, 2004). TLR4, the best characterized member of the TLR family, is the receptor of lipopolysaccharide (LPS) of gram-negative bacteria (Medzhitov et al., 1997), but also can be activated by endogenous ligands such as FAs (Lee et al., 2001; Wong et al., 2009). Expression of TLR4 has been found in pancreatic acinar cells of rats treated with LPS (Bonior et al., 2012) and in pancreas of rats with experimentally induced AP (Li et al., 2005).

PPARs ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$ ) are a family of ligand inducible transcription factors that regulate the lipid metabolism and modulate the inflammation (Bensinger and Tontonoz, 2008).

PPAR $\gamma$  negatively regulates the expression of inflammatory genes by interfering with NF- $\kappa$ B transcriptional activity (Delerive et al., 1999). PPAR $\gamma$  activation has shown to exert protective effects on inflammatory responses, AP included (Abdelrahman et al., 2005; Ding et al., 2013).

The current study was undertaken to assess whether pancreatic acinar cells are target of the action of AA. They are directly exposed to an environment with high AA levels during AP as a result of the action of PLA<sub>2</sub>, an enzyme leaked in high amounts from acinar cells into the interstitium (Mayer et al., 1998). Given that acinar cells have demonstrated to be the initial source of cytokines during AP (Yubero et al., 2009a, 2009b), *in vitro* experiments with isolated pancreatic acini become a useful model to investigate the molecular mechanisms by which AA exerts its role on inflammation at early stages of the disease. With this aim we investigate the molecular links between AA and the acinar inflammatory response, paying special attention to the analysis of the interaction between TLR4 and PPAR $\gamma$  in the signaling mechanisms triggering the expression of inflammatory genes. In addition, we examined in *in vivo* studies the role of TLR4 and PPAR $\gamma$  pathways in the pathophysiology of AP as well as the potential of either inhibiting TLR4 or activating PPAR $\gamma$  pathways to alleviate the severity of the disease.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats (250–300 g body weight) were supplied by the experimental animal service of the University of Salamanca (Spain). They were housed individually in cages, maintained at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  using a 12-h light/dark cycle and fed with standard laboratory chow (Teckled-Harlan 2014, Mucedola, Milan, Italy) and tap water *ad libitum*. The animals were fasted overnight before the experiments but they were allowed free access to water. The study was performed in accordance with European Community guidelines (2010/63/EU) and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Salamanca (Spain).

### 2.2. In vitro experiments

#### 2.2.1. Isolation and treatment of pancreatic acini

After 12 h fasting and under anesthesia with sodium pentobarbital (3 mg/100 g body weight, intraperitoneally), pancreas of control rats was removed in order to isolate pancreatic acini by digestion with collagenase as previously described (Mateu et al., 2014). Afterwards, pancreatic acini were resuspended in a previously oxygenated solution (pH 7.4) containing 25 mM HEPES, 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 mM glucose, 1% essential aminoacid mixture, 1% (w/v) bovine serum albumin, 0.01% (w/v) soybean trypsin inhibitor and incubated (5% CO<sub>2</sub>, at 37 °C, under sterile conditions) for 1 h in the absence or presence of AA (30–300  $\mu\text{M}$ ). The individual role of TLR4 and PPAR $\gamma$  was investigated in the same set of experiments.

For this, either the TLR4 inhibitor, Ethyl(6R)-6-[N-(2-chloro-4-fluorophenyl) sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242) (Selleckchem, Houston, U.S.A.), at a concentration of 5  $\mu\text{M}$  was added 45 min before or the PPAR $\gamma$  agonist, 15-Deoxy- $\Delta$ (12,14)-prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) (Calbiochem, Darmstadt, Germany), at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  was added 5 min after initiating the incubation of pancreatic acini in the absence or presence of AA.

In other set of experiments, the cyclooxygenase inhibitor Celecoxib (Selleckchem), at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  was added 10 min before initiating the incubation of acini in the absence or presence of AA to investigate the role of AA-derived metabolites.

Pancreatic acini incubated in the medium containing the vehicle (0.02% DMSO) but in the absence of AA, TAK-242, 15d-PGJ<sub>2</sub> or Celecoxib were considered as the control group.

Concentrations of TAK-242 15d-PGJ<sub>2</sub> and celecoxib in the range of concentrations previously referenced (Gupta et al., 2012; Gutierrez et al., 2008), or commercially recommended were assessed in preliminary studies (data not shown). No significant acini damage was found at the concentration finally used.

#### 2.2.2. Lactate dehydrogenase (LDH) activity

Cell injury was measured by determining lactate dehydrogenase (LDH) activity according to the method of Gutmann and Wahlefel (1974). Changes in absorbance due to  $\beta$ -nicotinamide dinucleotide<sup>+</sup> formation were recorded at 339 nm at 30 °C. We computed the total LDH and calculated the LDH leakage as percentage of the total measured inside and outside cells.

#### 2.2.3. Eicosanoid measurement

Aliquots of pancreatic acini suspension (400–600  $\mu\text{g}$  cell protein) incubated in the absence or presence of AA were centrifuged at  $400 \times g$  for 5 min. Concentrations of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) were measured in the supernatant by enzyme immunoassay (EIA) using commercially available kits (Arbor Assays and Cayman Chemical Company, Michigan, USA; respectively) according to the manufacturer's guidelines. All samples were run in duplicated and averaged. Results are expressed as pg/mg cell protein.

#### 2.2.4. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was isolated from pancreatic acini using RNAeasy kit treated with amplification grade DNase 1 (Qiagen, Valencia, Spain) according to the manufacturer's instructions. The integrity of RNA based on the presence of well-defined 28S and 18S rRNA bands was assessed in 1% agarose gel and RNA concentration was measured by spectrometry. For first strand cDNA synthesis, one microgram of total RNA was reverse-transcribed using the iScript cDNA synthesis kit for RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). cDNA was amplified by a polymerase chain reaction (PCR) on a StepOne systems (Applied Biosystems, CA, USA) using IQ SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) and the sequences of primers (Roche) for each gene specified in the Table 1. The cDNA was amplified by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 20 s. Amplifications were performed in triplicate and the melting curves were analyzed to validate product specificity. The abundance of each transcript was normalized to that of 18S (internal standard) obtained in the same sample. The relative mRNA expression was calculated using the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method and the results expressed as the fold change vs control acini (vehicle-treated acini).

#### 2.2.5. Western blot analysis

Cytoplasmic and nuclear extracts of pancreatic acini were obtained as previously reported (Mateu et al., 2014). Immunoblot

**Table 1**  
Primers used to amplify mRNAs encoding inflammatory genes and 18S.

Gene name	Accession no.	Nucleotide sequence	Length (bp)
CCL2	NM.031530	Forward: 5'-TAGCATCCACGTGCTGTCTC-3' Reverse: 5'-CCGACTCATTGGGATCATCT-3'	91
P-selectin	NM.013114	Forward: 5'-TCTCTGCAACGAGGAGTTT-3' Reverse: 5'-GGTGTGACAGGACATTGTG-3'	174
TLR4	NM.019178	Forward: 5'-AGAAAATGCCAGGATGATGC-3' Reverse: 5'-AGGGATTCAAGCTTCTCGGT-3'	95
PPAR $\gamma$	NM.013124	Forward: 5'-AGGGCGATCTTGACAGGAAA-3' Reverse: 5'-CGAAACTGGCACCTTGAAA-3'	164
18S	NR.046237	Forward: 5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3' Reverse: 5'-GATCCGAGGGCCTCACTAAC-3'	70

CCL2: Chemokine (C–C motif) ligand 2, TLR4: Toll-like receptor 4, PPAR $\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ .

analysis was performed as Yubero et al. (2009a) described. Cytoplasmic and nuclear extracts from pancreatic acini (30  $\mu$ g) were individually separated by 12% SDS-PAGE and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. Phospho-MAPKs (p-MAPKs), phospho-Janus kinase (p-JAK), I $\kappa$ B- $\alpha$  and TLR4 were analyzed in cytoplasm and p65, p-STAT3 and PPAR $\gamma$  in nuclear extracts. After blocking the non-specific binding, blots were incubated overnight with the primary antibody (1:1000 dilution) against either each of the three p-MAPKs (c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) and p38), p-JAK, I $\kappa$ B- $\alpha$ , p65, p-STAT3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A.), TLR4, PPAR $\gamma$  (Abcam, Cambridge, U.K.),  $\alpha$ -tubulin and lamin B1 (Cell Signaling Technology), used as the load control of cytoplasmic and nuclear protein, respectively. Afterwards, the blots were incubated with the respective horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2000 dilution) and the signal developed with Phototope-HRP Detection kit (Cell Signaling Technology). Image J 1.32 software from <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html> was used to quantify the intensity of the bands. Relative protein levels were calculated compared to the either  $\alpha$ -tubulin or lamin B1 standards. Results are expressed as fold increase vs control acini.

### 2.3. In vivo experiments

#### 2.3.1. Model of AP and treatments

After 12 h fasting, the rats were anaesthetized with 2–3% isoflurane, Forane (Abott, Madrid, Spain) and AP was induced by bile-pancreatic duct obstruction (BPDO). For this, after a median laparotomy, the common bile-pancreatic duct was ligated at the distal part, close to its exit to the duodenum. In sham-operated rats, the duct was dissected but not ligated. Afterwards, the abdominal wall was closed in a double layer and the animals were placed again in cages with free access to water. Post-operative analgesia was maintained by subcutaneous injections of buprenorphine (0.2 mg/kg/8 h). Twelve hours after the surgical procedure, laparotomy was performed again, the ascitic fluid was harvested by aspiration from the peritoneal cavity and the pancreas excised and removed. Finally, samples of blood were also collected in heparinized tubes.

Rats were randomly divided into six groups: (1) sham-operated control group ( $n=5$ ); (2) sham-operated rats receiving TAK-242 (3 mg/kg, intraperitoneally,  $n=5$ ); (3) sham-operated rats receiving 15d-PGJ2 (1 mg/kg, intraperitoneally,  $n=5$ ); (4) rats with AP induced by BPDO ( $n=5$ ); (5) rats subjected to BPDO receiving TAK-242 (3 mg/kg, intraperitoneally,  $n=5$ ) immediately after inducing AP and (6) rats subjected to BPDO receiving 15d-PGJ2 (1 mg/kg intraperitoneally,  $n=5$ ) immediately after inducing AP.

Preliminary studies were carried out in sham-operated rats receiving intraperitoneal injections (1 ml/kg) of 5% DMSO used as

the vehicle of TAK-242 and 15d-PGJ2, but no significant effect was found (data not shown).

#### 2.3.2. Blood analysis

In plasma, analysis of lipase activity by turbidimetric assay and of IL-1 $\beta$  concentrations by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were performed using commercial kits (Randox, Antrim, UK, and Bender MedSystems, Vienna, Austria, respectively), strictly following supplier's recommendations. Also, concentrations of eicosanoids (PGE2 and TXB2) were measured by EIA as mentioned above. All samples were run in duplicated and averaged. Hematocrit was determined in heparinized blood samples.

#### 2.3.3. Myeloperoxidase (MPO) activity determination

Neutrophil infiltration was estimated in pancreas by measuring MPO activity, following the method of Bhatia and Hegde (2007). Briefly, tissue samples were homogenized in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTAB). After four cycles of freezing and thawing, the homogenate was disrupted by sonication. Samples were then centrifuged (10,000  $\times$  g, 5 min, 4  $^{\circ}$ C) and the supernatant was incubated with 3,3',5',5-tetramethylbenzidine (TMB) reagent for 110 s at 37  $^{\circ}$ C for the MPO assay. The reaction was stopped with 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the absorbance measured at 450 nm.

#### 2.3.4. Pancreatic tissue water content

The wet/dry weight ratio was calculated to evaluate interstitial edema. For this purpose, fresh pancreata were weighed before and after drying for 96 h at 100  $^{\circ}$ C.

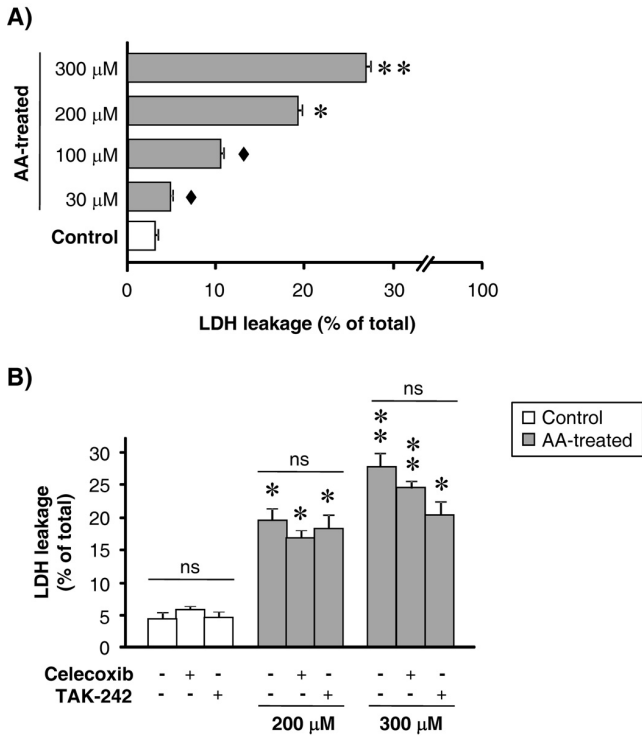
### 2.4. Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was carried out using analysis of variance (ANOVA) followed by Scheffé test to evaluate differences between individual groups.  $p$  Values lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Cell injury

LDH leakage was determined as an indicator of the cell injury. As Fig. 1A shows, less than 5% of LDH was released from pancreatic acini incubated in the absence of AA (control group). Acinar cell injury increased in the presence of AA in a dose-dependent way. Although in comparison with controls higher LDH leakage was found in acini exposed to AA at concentrations of 30  $\mu$ M and 100  $\mu$ M, the differences did not reach statistical significance. However, LDH release significantly increased in acini treated with 200  $\mu$ M ( $p<0.05$ ) and 300  $\mu$ M ( $p<0.01$ ) of AA. Given that cell viability is required to maintain the mechanisms involved in the



**Fig. 1.** Leakage of lactate dehydrogenase (LDH) from pancreatic acini incubated for 1 h in the absence (control group) or the presence of arachidonic acid (AA). Dose-response effect to different AA concentrations (30–300 μM) (A). Effect of the cyclooxygenase inhibitor Celecoxib (10 μM) and the TLR4 inhibitor TAK-242 (5 μM) on acini incubated in the absence (control group) or the presence of lethal AA concentrations (B). Results are expressed as % of total LDH (measured inside and outside cells). Values are means ± SEM of five experiments. ANOVA followed by Scheffé test showed significant differences vs control acini (vehicle-treated acini) (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) and vs acini treated with 300 μM of AA (♦  $p < 0.05$ ). No significance (ns) was found when compared acini non-treated and treated with Celecoxib or TAK-242.

synthesis of inflammatory mediators and to achieve an appropriate response to either the stimulus, 100 μM was the concentration used in the rest of experiments to study the acinar inflammatory response induced by AA, since this proved to be the highest concentration that did not show significant effects on cell damage.

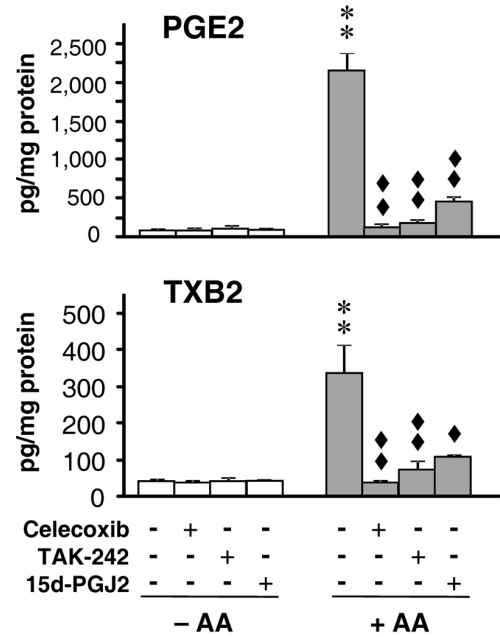
In order to find out whether the cell damage induced is directly exerted or mechanically-mediated induced by high AA concentrations, inhibitors of COX-2 or TLR4 were used. Neither Celecoxib nor TAK-242 changed the LDH leakage either in acini incubated in the absence of AA (controls) or in the presence of lethal concentrations of AA (Fig. 1B).

### 3.2. Eicosanoid synthesis

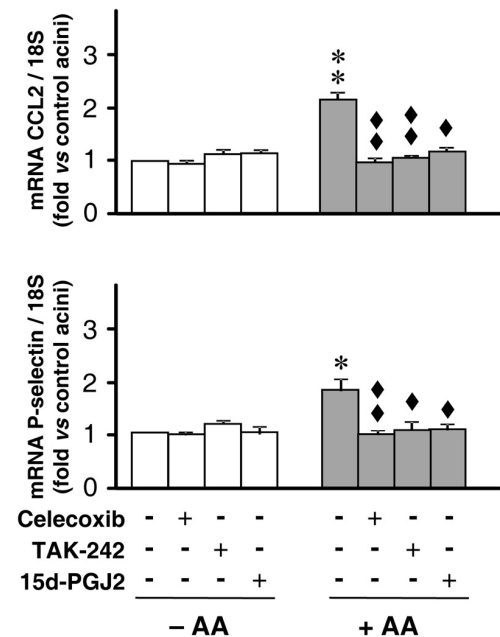
As Fig. 2 shows, PGE2 and TXB2 production in pancreatic acini was significantly ( $p < 0.01$ ) increased by incubation with AA. This increase was blocked by either Celecoxib, TAK-242 or 15d-PGJ2. Neither Celecoxib, nor TAK-242, nor 15d-PGJ2 had any effect in pancreatic acini incubated in the absence of AA.

### 3.3. Expression of inflammatory mediators (CCL2 and P-selectin)

Fig. 3 shows the acinar gene expression of CCL2 and P-selectin analyzed by qRT-PCR. Pancreatic acini incubated in the presence of AA showed significant increases both in CCL2 ( $p < 0.01$ ) and P-selectin ( $p < 0.05$ ) mRNA expression (2.1- and 1.8-fold of control group, respectively).

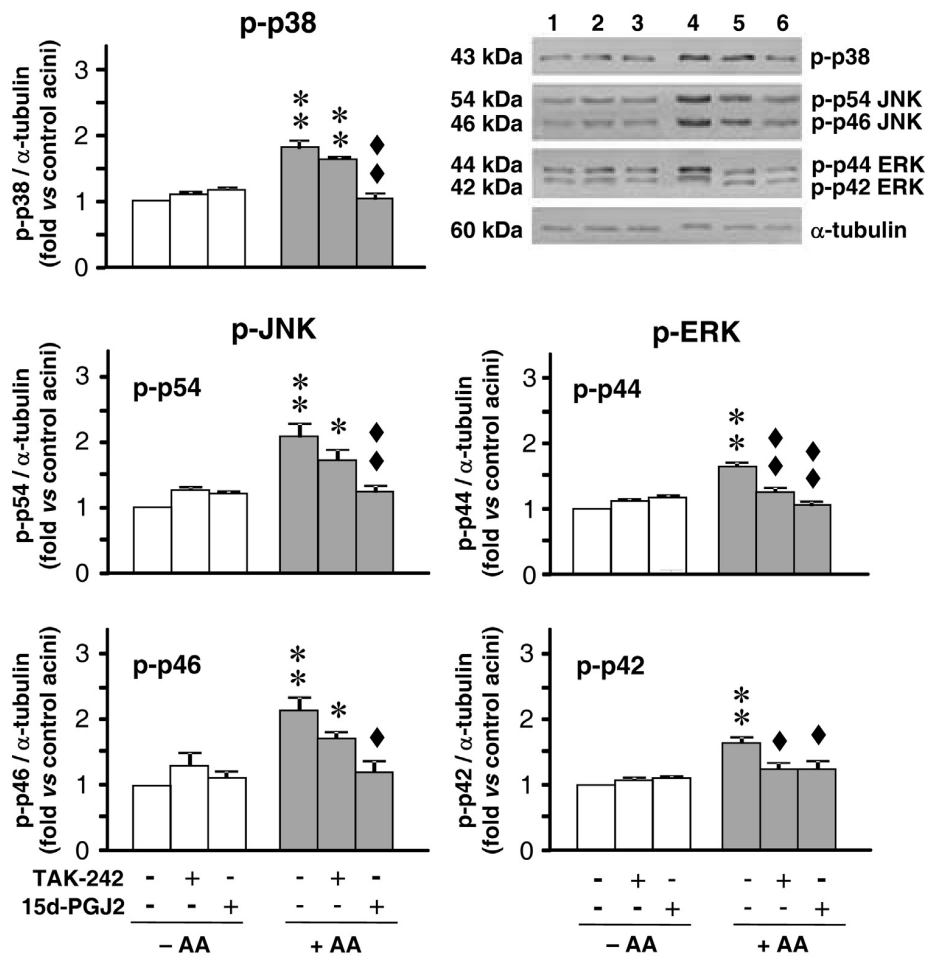


**Fig. 2.** Production of prostaglandin E2 (PGE2) and thromboxane B2 (TXB2) in pancreatic acini incubated for 1 h in the absence or the presence of arachidonic acid (AA) at 100 μM. The individual effects of the cyclooxygenase inhibitor Celecoxib (10 μM), the TLR4 inhibitor TAK-242 (5 μM) and the PPARγ agonist 15d-PGJ2 (10 μM) were assessed in both AA-untreated and AA-treated pancreatic acini. Results are expressed as pg/mg cell protein. Data are means ± SEM of 5 experiments. ANOVA followed by Scheffé test showed significant differences vs controls (vehicle-treated acini) (\*\*  $p < 0.01$ ) and vs AA alone (♦  $p < 0.05$ , ♦♦  $p < 0.01$ ).



**Fig. 3.** mRNA expression of CCL2 and P-selectin in pancreatic acini incubated for 1 h in the absence or the presence of arachidonic acid (AA) at 100 μM. The individual effects of the cyclooxygenase inhibitor Celecoxib (10 μM), the TLR4 inhibitor TAK-242 (5 μM) and the PPARγ agonist 15d-PGJ2 (10 μM) were assessed in both AA-untreated and AA-treated pancreatic acini. CCL2/18S or P-selectin/18S ratio was considered. Data (means ± SEM) are expressed as fold vs control acini (vehicle-treated acini). Number of experiments: 5. ANOVA followed by Scheffé test showed significant differences vs controls (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ), and vs AA alone (♦  $p < 0.05$ , ♦♦  $p < 0.01$ ).





**Fig. 4.** Phosphorylated mitogen activated protein kinases (p-MAPKs): p38, c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in cytoplasmic extracts of pancreatic acini incubated for 1 h in the absence or the presence of arachidonic acid (AA) at 100  $\mu$ M. The effects of the TLR4 inhibitor TAK-242 (5  $\mu$ M), and the PPAR $\gamma$  agonist 15d-PGJ2 (10  $\mu$ M), was assessed in both AA-untreated and AA-treated pancreatic acini. Representative immunoblots of 5 independent experiments are shown in upper right panel: lane 1: vehicle-treated acini (control), lane 2: TAK-242-treated acini, lane 3: 15d-PGJ2-treated acini, lane 4: acini incubated with AA, lane 5: acini incubated with AA after TAK-242 treatment, lane 6: acini incubated with AA and 15d-PGJ2. Histograms represent the results of the densitometric analysis and show the ratios for each p-MAPK/ $\alpha$ -tubulin (loading control). Data (means  $\pm$  SEM) are expressed as fold vs control acini. ANOVA followed by Scheffé test showed significant differences vs controls (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) and vs AA alone ( $\blacklozenge p < 0.05$ ,  $\blacklozenge p < 0.01$ ).

No change in the expression of inflammatory mediators was found in control acini in the presence of Celecoxib, TAK-242 or 15d-PGJ2 in the incubation medium, but they completely repressed the acinar overexpression of CCL2 and P-selectin found in AA-treated acini.

### 3.4. Activation of MAPKs

Phosphorylation of MAPKs (p38, JNK and ERK) was analyzed by Western blot to assess their activation (Fig. 4). The results indicated a significant ( $p < 0.01$ ) phosphorylation of the three MAPKs in pancreatic acini in response to AA, with the following fold increases compared with the control group: 1.8 for p-p38, 2.1 for both p-p54 and p-p46 JNK, 1.7 and 1.6 for p-p44 and p-p42 ERK, respectively.

No significant change was found in control acini treated with TAK-242. AA-induced MAPK phosphorylation was reduced by TAK-242 pre-treatment, although the effect only reached statistical significance on p-p44 ERK ( $p < 0.01$ ) and p-p42 ERK ( $p < 0.05$ ), whose values were not significantly different from control acini.

Neither 15d-PGJ2 altered MAPK phosphorylation in control acini, but it significantly reduced the levels of p-p38 ( $p < 0.01$ ),

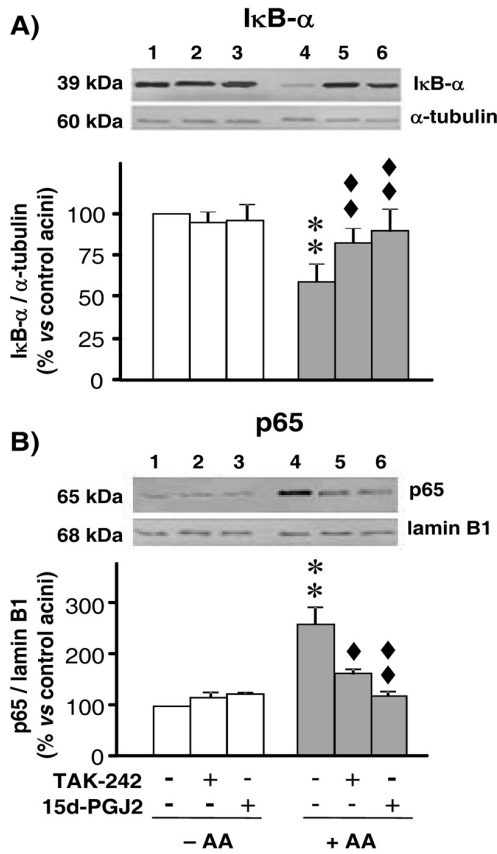
p-p54 JNK ( $p < 0.01$ ), p-p46 JNK ( $p < 0.05$ ), p-p44 ERK ( $p < 0.01$ ) and p-p42 ERK ( $p < 0.05$ ) in acini incubated with AA.

### 3.5. Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B activity was evaluated by two complementary analyses: degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  (Fig. 5A) and translocation of p65 to the nucleus (Fig. 5B). AA induced a significant ( $p < 0.01$ ) I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation (40.75% vs controls) as well as an increase in p65 at nuclear level (264% vs controls). Both findings indicated acinar NF- $\kappa$ B activation in response to AA.

TAK-242 alone did not show any effect on acinar NF- $\kappa$ B activity; however, it reduced the NF- $\kappa$ B activation mediated by AA, as deduced from the higher cytosolic I $\kappa$ B- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ) and the lower nuclear p65 ( $p < 0.05$ ) levels found in TAK-treated acini exposed to AA in comparison with those non-treated with TAK-242.

15d-PGJ2 maintained the cytosolic I $\kappa$ B- $\alpha$  and nuclear p65 levels at control values in pancreatic acini incubated either in the absence or the presence of AA. Therefore, the PPAR $\gamma$  agonist hindered the acinar NF- $\kappa$ B activation mediated by AA.



**Fig. 5.** Cytosolic IκB-α (A) and nuclear p65 (B) of pancreatic acini incubated for 1 h in the absence or the presence of arachidonic acid (AA) at 100 μM. The effects of the TLR4 inhibitor TAK-242 (5 μM), and the PPARγ agonist 15d-PGJ2 (10 μM), was assessed in both AA-untreated and AA-treated pancreatic acini. Representative immunoblots of 5 independent experiments are shown: lane 1: vehicle-treated acini (control), lane 2: TAK-242-treated acini, lane 3: 15d-PGJ2-treated acini, lane 4: acini incubated with AA, lane 5: acini incubated with AA after TAK-242 treatment, lane 6: acini incubated with AA and 15d-PGJ2. Histograms represent the results of the densitometric analysis and show the ratios for either IκB-α vs α-tubulin (loading control) or p65 vs lamin B1 (loading control). Data (means ± SEM) are expressed as percentage of control acini. ANOVA followed by Scheffé test showed significant differences vs controls (\*\*  $p < 0.01$ ) and vs AA alone (◆  $p < 0.05$ , ◆◆  $p < 0.01$ ).

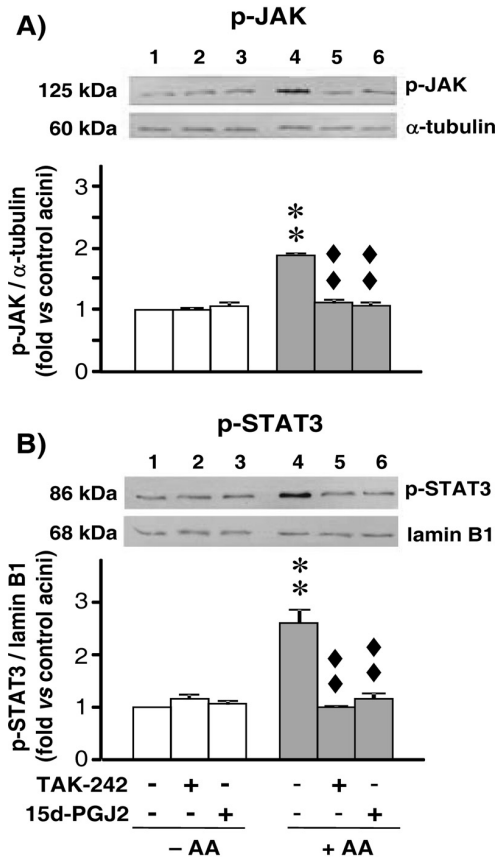
### 3.6. Activation of the JAK/STAT3 pathway

The activation of the JAK/STAT3 pathway was assessed by Western blot analysis of the phosphorylated forms of JAK (Fig. 6A) and STAT3 (Fig. 6B) in cytosolic and nuclear extracts, respectively.

A significant ( $p < 0.01$ ) increase in both p-JAK and p-STAT3 (1.8- and 2.6-fold vs control group, respectively) was found in pancreatic acini exposed to AA. These effects were significantly ( $p < 0.01$ ) reduced to control values by the presence of either TAK-242 or 15d-PGJ2 in the incubation medium. Changes in p-JAK and p-STAT3 levels were not found in control acini treated either with TAK-242 or 15d-PGJ2.

### 3.7. Expression of TLR4

AA induced a significant ( $p < 0.01$ ) increase in TLR4 mRNA (Fig. 7A) and protein (Fig. 7B) expression, which did not vary significantly in the presence of Celecoxib. 15d-PGJ2 blocked the TLR4 overexpression found in AA-treated pancreatic acini, but no effect was exerted on controls.



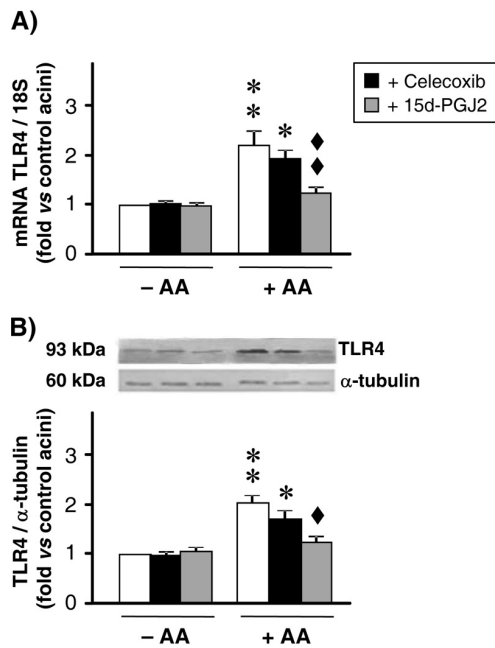
**Fig. 6.** Phosphorylated janus kinase (p-JAK) in cytosolic extracts (A) and phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3) in nuclear extracts (B) of pancreatic acini incubated for 1 h in the absence or the presence of arachidonic acid (AA) at 100 μM. The effects of the TLR4 inhibitor TAK-242 (5 μM), and the PPARγ agonist 15d-PGJ2 (10 μM), was assessed in both AA-untreated and AA-treated pancreatic acini. Representative immunoblots of 5 independent experiments are shown: lane 1: vehicle-treated acini (control), lane 2: TAK-242-treated acini, lane 3: 15d-PGJ2-treated acini, lane 4: acini incubated with AA, lane 5: acini incubated with AA after TAK-242 treatment, lane 6: acini incubated with AA and 15d-PGJ2. Histograms represent the results of the densitometric analysis and show the ratios for either p-JAK vs α-tubulin (loading control) or p-STAT3 vs lamin B1 (loading control). Data (means ± SEM) are expressed as fold vs control acini. ANOVA followed by Scheffé test showed significant differences vs controls (\*\*  $p < 0.01$ ) and vs AA alone (◆◆  $p < 0.01$ ).

### 3.8. Expression of PPARγ

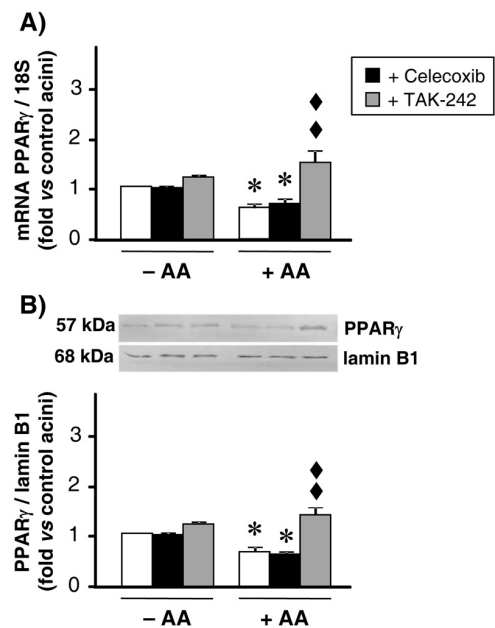
mRNA and protein PPARγ expression was examined (Fig. 8A and B). In comparison with pancreatic acini incubated in the absence of AA, PPARγ expression (mRNA and protein) was found significantly ( $p < 0.05$ ) reduced in acini exposed to AA. This effect was maintained in the presence of celecoxib. TAK-242 did not change the PPARγ expression in untreated acini, but it prevented the down-regulation of PPARγ expression exerted by AA.

### 3.9. In vivo experiments: Effect of TAK-242 and 15d-PGJ2 on the severity of AP

Fig. 9 shows the results of the indicators of the severity of AP in the different animal groups. Neither TAK-242 nor 15d-PGJ2 exerted significant effects in sham-operated rats. However, both treatments significantly reduced the increases in hematocrit, pancreatic water content, volume of ascitic fluid and plasma concentrations of IL-1β and eicosanoids (PGE2, TXB2) found in rats with AP to values not significantly different from that of sham-operated rats. Treatment with TAK-242 or 15d-PGJ2 also significantly ( $p < 0.05$ ) reduced the



**Fig. 7.** Expression of TLR4 in pancreatic acini incubated for 1 h in the absence or the presence of arachidonic acid (AA) at 100  $\mu$ M. The individual effects of the cyclooxygenase inhibitor Celecoxib (10  $\mu$ M) and the PPAR $\gamma$  agonist 15d-PGJ2 (10  $\mu$ M) was assessed in both AA-untreated and AA-treated pancreatic acini. (A) mRNA expression was calculated according with TLR4/18S. (B) Representative immunoblots of protein expression and densitometric analysis showing the ratio of TLR4 vs  $\alpha$ -tubulin (loading control). Data (means  $\pm$  SEM) are expressed as fold vs control acini (vehicle-treated acini). Number of experiments: 5. ANOVA followed by Scheffé test showed significant differences vs controls (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ), and vs AA alone ( $\blacklozenge$   $p < 0.01$ ).



**Fig. 8.** mRNA expression of PPAR $\gamma$  in pancreatic acini incubated for 1 h in the absence or the presence of arachidonic acid (AA) at 100  $\mu$ M. The individual effects of the cyclooxygenase inhibitor Celecoxib (10  $\mu$ M) and the TLR4 inhibitor TAK-242, (5  $\mu$ M) was assessed in both AA-untreated (control) and AA-treated pancreatic acini. (A) mRNA expression was calculated according with PPAR $\gamma$ /18S ratio. (B) Representative immunoblots of protein expression and densitometric analysis showing the ratio of PPAR $\gamma$  vs lamin B1 (loading control). Data (means  $\pm$  SEM) are expressed as fold vs control acini (vehicle-treated acini). Number of experiments: 5. ANOVA followed by Scheffé test showed significant differences vs controls (\*  $p < 0.05$ ), and vs AA alone ( $\blacklozenge$   $p < 0.01$ ).

high levels of MPO activity found in pancreas of rats with AP, although the values remained significantly ( $p < 0.01$ ) higher than in sham-operated rats. TAK-242 and 15d-PGJ2 treatments failed to reduce the hyperlipasemia found in rats with AP.

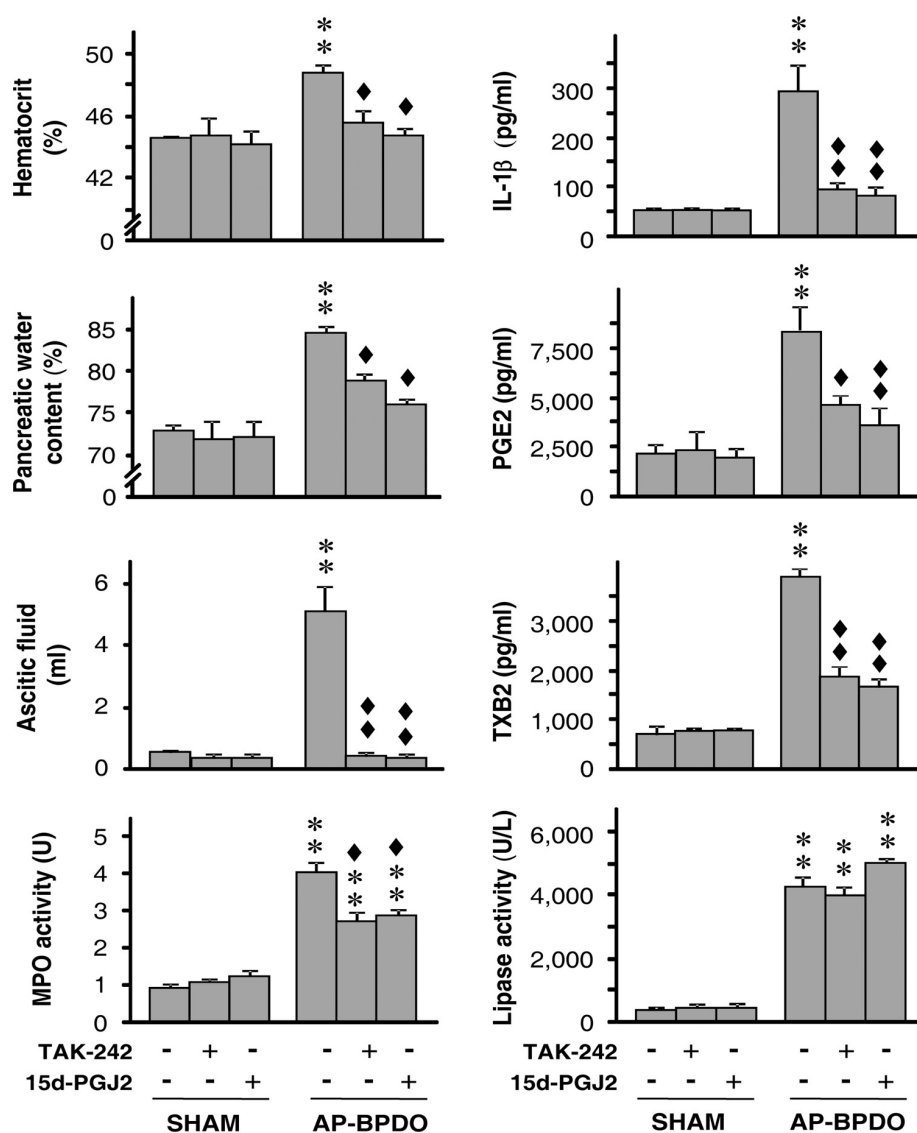
#### 4. Discussion

FAs released from peripancreatic fat during AP have demonstrated to act as key factors in triggering inflammatory response in pancreatic acinar cells (Mateu et al., 2014). Although pro- and anti-inflammatory effects have been reported for FAs depending on their chemical structure and target cell (Volpe and Nogueira-Machado, 2013), there is a general agreement in considering the actions of AA to be pro-inflammatory (Khan et al., 2014; Mariotto et al., 2007; Nguyen et al., 2012).

Our results indicated that AA at sublethal concentrations within the range of concentrations found in serum of patients with AP (Sztefko and Panek, 2001) exerted a pro-inflammatory action on pancreatic acinar cells. Pro-inflammatory effects of AA-derived metabolites are well documented (Kawahara et al., 2015; Sun et al., 2007), however, a complete understanding of the molecular mechanisms triggered by AA is not well-established. Data obtained in the current study by using Celecoxib in the medium of incubation of acini with AA provide evidence that an elevated generation of COX-2 downstream products (PGE2 and TXB2) is involved in the AA-induced up-regulation of both CCL2 and P-selectin in pancreatic acini. However, Celecoxib did not show any influence on the changes in TLR4 and PPAR $\gamma$  expression found in acini exposed to AA, thus indicating that AA itself, but not the AA metabolites, directly up-regulated TLR4 and down-regulated PPAR $\gamma$  in pancreatic acini.

TLR4 and PPAR $\gamma$  trigger opposite effects on the molecular mechanisms associated with inflammatory responses (Bensinger and Tontonoz, 2008; Volpe and Nogueira-Machado, 2013). TLRs have traditionally been considered the sensors which mediate the infection-induced inflammation by recognizing pathogens and activating downstream signaling pathways which lead to the up-regulation of inflammatory gene expression (Akira and Takeda, 2004). By contrast, PPARs activation plays a protective role in inflammatory responses, both PPAR $\alpha$  (Delerive et al., 1999; Ding et al., 2013) and PPAR $\gamma$  (Xu et al., 2011). TLR4 is recognized as the LPS receptor (Poltorak et al., 1998), but there is an increasing body of evidence supporting the notion that FAs may also act as endogenous TLR4 ligands. Whereas TLR4-mediated activation of inflammatory pathways in response to saturated FAs has been demonstrated in different kind of cells (Gupta et al., 2012; Lee et al., 2001; Weatherill et al., 2005; Yeop Han et al., 2010), TLR4 activation has not yet been reported for AA. In addition, for the first time we examine whether TLR4 acts as a molecular link between FAs and the inflammatory response triggered in pancreatic acini.

The presence of TLR4 has been evidenced in acinar cells isolated from pancreas of rats treated with LPS (Bonior et al., 2012) and in pancreas of rats with AP (Li et al., 2005; Sawa et al., 2007). Although the relationship between TLR4 up-regulation and inflammation is widely accepted, the molecular mechanisms involved are not completely understood. Results obtained in TLR4-deficient mice demonstrated that TLR4 plays a role in the pathophysiology of AP (Sawa et al., 2007; Sharif et al., 2009). According to these studies, LPS might trigger the activation of TLR4-mediated inflammation at advanced phases of AP, when the translocation of bacteria through the intestinal barrier occurs. However, Sharif et al. (2009) demonstrated TLR4 activation in AP in the absence of LPS, the natural setting at initial stages of the disease. To explain the involvement of TLR4 at early AP, it is therefore critical to investigate the role of TLR4 in the initial inflammatory response triggered by pancreatic



**Fig. 9.** Indicators of the severity of acute pancreatitis (AP) in sham-operated rats and rats with AP induced by bile-pancreatic duct obstruction (BPDO) for 12 h, both untreated or treated with either the TLR4 inhibitor TAK-242 (3 mg/kg, intraperitoneally) or the PPAR $\gamma$  agonist 15d-PGJ2 (1 mg/kg, intraperitoneally). Hematocrit, water content in pancreas, volume of ascites, plasma concentrations of IL-1 $\beta$ , prostaglandin E2 (PGE2), thromboxane B2 (TXB2) and lipase activity and myeloperoxidase (MPO) activity in pancreas were analyzed. Data are means  $\pm$  SEM of five animals/group. ANOVA followed by Scheffé test showed significant differences vs controls (\*\*  $p < 0.01$ ), and vs AP ( $\blacklozenge$   $p < 0.05$ ,  $\blacklozenge$   $p < 0.01$ ).

acinar cells in response to endogenous agonists, such as AA, which are generated as a result of the initial acinar injury.

TAK-242, a specific pharmacological inhibitor of the TLR4 pathway, has been used in the current study to unravel whether the molecular mechanisms activated by AA to trigger the inflammatory response in acinar cells are TLR4-dependent and, in such a case, to ascertain the specific role of TLR4. TAK-242 significantly reduced the COX-2 mediated generation of AA metabolites and repressed the up-regulation of inflammatory genes in acinar cells exposed to AA. In line with previous studies carried out in macrophages stimulated with saturated FAs (Lee et al., 2001) or LPS (Sha et al., 2007) as TLR4 ligands, our data on AA-stimulated acini reveal that COX-2 activation is an intermediate mechanism in the response triggered by activation of TLR4 pathway.

Activation of NF- $\kappa$ B and JAK/STAT3 signaling pathways has been previously reported to be involved in the expression of CCL2 and P-selectin in acinar cells in other inflammatory settings (Gallmeier

et al., 2005; Pereda et al., 2004; Ramnath et al., 2007; Ramudo et al., 2009). The use of TAK-242 revealed that mediated by TLR4 activation, NF- $\kappa$ B and JAK/STAT3 signaling pathways act as upstreams of the acinar overexpression of inflammatory genes induced by PGEs and TXB2. In addition, the involvement of these pathways in the synthesis of the eicosanoids may not be discarded since interaction between TLR4 and NF- $\kappa$ B associated with overexpression of COX-2 has been reported in macrophages in response to LPS (Lee et al., 2001). Also TLRs have been involved in the activation of the MAPK pathways in macrophages (Hambleton et al., 1996; McGettrick and O'Neill, 2004). Our results indicated a selective effect on the different MAPK members, so that phosphorylation of ERK, but neither p38 nor JNK, appears to contribute to the inflammatory response triggered by TLR4, suggesting certain cell specificity in the inflammatory downstream signaling pathways activated by TLR4.

In addition, the use of the TLR4 inhibitor revealed that the down-regulation of PPAR $\gamma$  induced by AA is TLR4-dependent, a finding

previously reported in adipocytes by Nguyen et al. (2012). The combination of these results indicates that TLR4 plays a key role in the inflammatory response of pancreatic acini to AA by triggering two complementary effects: the synthesis of downstream products able to activate pro-inflammatory signaling pathways and the down-regulation of the expression of PPAR $\gamma$ , a ligand-inducible transcription factor with anti-inflammatory effects.

The current study suggests that the presence of AA would play an important role from early AP stages on, by activating inflammatory and repressing anti-inflammatory pathways in pancreatic acinar cells, the initial source of cytokines during the disease (Yubero et al., 2009a, 2009b). In addition, the acinar cell injury induced by high AA concentrations lead us to hypothesize that AA might be involved in the development of pancreatic necrosis at advanced stages of severe AP. However, in contrast with the inflammatory response, the cytotoxic effects are not mediated by eicosanoids neither can they be attributed to TLR4 activation. Our results are consistent with the notion that AA exerts a direct effect on the physical-chemical properties of the acinar membrane which lead to the loss of its integrity. This alteration might be the result of the lipid peroxidation promoted by pro-oxidant reactants generated by AA (Finstad et al., 1994; Shiose and Sumimoto, 2000) on cell membrane lipids.

PPAR $\gamma$  has been found expressed in many kinds of cells, including pancreatic acinar cells (Wan et al., 2008). The use of 15d-PGJ<sub>2</sub>, the most potent PPAR $\gamma$  agonist (Forman et al., 1995), inhibited the generation of AA-derived downstream products and, as a result, prevented the up-regulation of CCL2 and P-selectin in AA-treated acini. In line with previous reports, the current study demonstrated that the PPAR $\gamma$  agonist exerted the anti-inflammatory effect by interfering in the activation of MAPKs (Yano et al., 2007) and antagonizing NF- $\kappa$ B and JAK/STAT3 pathways (Ricote et al., 1998). Furthermore, activation of PPAR $\gamma$  pathway with 15d-PGJ<sub>2</sub> totally repressed the acinar expression of TLR4 induced by AA. Since TLR4 acts as the initial upstream, this negative cross-talk between PPAR $\gamma$  and TLR4 is a key mechanism to repress the inflammatory cascade of events triggered by AA, preventing the switch of the initial signal for the synthesis of AA metabolites and subsequently the activation of pathways which lead to expression of inflammatory genes. In this line, a protective role for PPAR $\gamma$  in AP has been previously reported (Xu et al., 2011).

Our *in vitro* data suggest that inhibition of TLR4 or activation of PPAR $\gamma$  pathways could be beneficial in the treatment of AP, a notion reinforced by the *in vivo* studies carried out in rats with BPDO-induced AP. Treatment either with TAK-242 or 15d-PGJ<sub>2</sub>, although did not prevent the hyperlipasemia, significantly reduced hematocrit and several indicators of inflammation found in rats with AP. The current study support the use of TAK-242 or 15d-PGJ<sub>2</sub> to reduce PGE<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub> in plasma of rats with AP. Consistent with previous studies carried out in other experimental AP models (Ding et al., 2013; Li et al., 2005; Sawa et al., 2007; Xu et al., 2011), our results indicate that TLR4 plays a key role in AP and support the use of TLR4 inhibitors, such as TAK-242, or PPAR $\gamma$  agonists, such as 15d-PGJ<sub>2</sub>, in therapeutic intervention in AP to alleviate the inflammatory response.

In conclusion, our study reports the molecular mechanisms that link AA and the acinar inflammatory response as well as gives new insights in the understanding of the pathophysiology of AP and the design of therapeutic strategies to palliate the severity of the disease. Through TLR4-dependent mechanisms, AA induced the generation of COX-downstream products which led to the up-regulation of CCL2 and P-selectin expression in pancreatic acini. TLR4, as initial signal transduction, triggered the activation of pro-inflammatory signaling pathways (ERK, NF- $\kappa$ B and JAK/STAT3) and prevented the anti-inflammatory activity by negatively regulating PPAR $\gamma$  expression. In turn, activation of PPAR $\gamma$  pathway

with 15d-PGJ<sub>2</sub> negatively regulated the expression of TLR4 genes and blunted the activation of the downstream signal pathways involved in the production of AA metabolites and the subsequent expression of inflammatory genes. *In vivo* experiments support the *in vitro* data, suggesting a key role of TLR4 in the pathophysiology of AP and reinforcing the notion that either drug antagonizing TLR4 or PPAR $\gamma$  agonists could have beneficial effects in the treatment of AP.

## 5. Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

## Acknowledgments

Elizabeth Nestor is gratefully acknowledged for her linguistic assistance. This work was supported by a research grant from Junta Castilla-León, Spain (BIO/SAG3/14).

## References

- Abdelrahman, M., Sivarajah, A., Thiemeermann, C., 2005. Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovasc. Res.* 65, 772–781.
- Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.
- Bensinger, S.J., Tontonoz, P., 2008. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 454, 470–477.
- Bhatia, M., Hegde, A., 2007. Treatment with antileukinate, a CXCR2 chemokine receptor antagonist, protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Regul. Pept.* 138, 40–48.
- Bonior, J., Jaworek, J., Kot, M., Konturek, S.J., Pierzchalski, P., 2012. Long-lasting effect of infant rats endotoxemia on heat shock protein 60 in the pancreatic acinar cells: involvement of toll-like receptor 4. *Int. J. Inflamm.* 2012, 354904.
- Deliver, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., et al., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32048–32054.
- Ding, J.L., Zhou, Z.G., Zhou, X.Y., Zhou, B., Wang, L., Wang, R., et al., 2013. Attenuation of acute pancreatitis by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in rats: the effect on Toll-like receptor signaling pathways. *Pancreas* 42, 114–122.
- Finstad, H.S., Kolset, S.O., Holme, J.A., Wiger, R., Farrants, A.K., Blomhoff, R., et al., 1994. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on proliferation and differentiation of promyelocytic leukemic HL-60 cells. *Blood* 84, 3799–3809.
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., Evans, R.M., 1995. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83, 803–812.
- Gallmeier, E., Schafer, C., Moubarak, P., Tietz, A., Plossl, I., Huss, R., et al., 2005. JAK and STAT proteins are expressed and activated by IFN-gamma in rat pancreatic acinar cells. *J. Cell. Physiol.* 203, 209–216.
- Gupta, S., Knight, A.G., Gupta, S., Keller, J.N., Bruce-Keller, A.J., 2012. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J. Neurochem.* 120, 1060–1071.
- Gutierrez, P.T., Folch-Puy, E., Bulbena, O., Closa, D., 2008. Oxidised lipids present in ascitic fluid interfere with the regulation of the macrophages during acute pancreatitis, promoting an exacerbation of the inflammatory response. *Gut* 57, 642–648.
- Gutmann, I., Wahlefel, A.W., 1974. L-(-)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, NY, pp. 1464–1468.
- Hambleton, J., Weinstein, S.L., Lem, L., DeFranco, A.L., 1996. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2774–2778.
- Irvine, R.F., 1982. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.* 204, 3–16.
- Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S., Sugimoto, Y., 2015. Prostaglandin E-induced inflammation: relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 414–421.
- Khan, S.A., Ali, A., Zahran, S.A., Damanhour, G., Azhar, E., Qadri, I., 2014. Unraveling the complex relationship triad between lipids, obesity, and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2014, 502749.
- Khanapure, S.P., Garvey, D.S., Janero, D.R., Letts, L.G., 2007. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 311–340.
- Lee, J.Y., Sohn, K.H., Rhee, S.H., Hwang, D., 2001. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 16683–16689.
- Li, Y., Zhou, Z.G., Xia, Q.J., Zhang, J., Li, H.G., Cao, G.Q., et al., 2005. Toll-like receptor 4 detected in exocrine pancreas and the change of expression in cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas* 30, 375–381.

- Mariotto, S., Suzuki, Y., Persichini, T., Colasanti, M., Suzuki, H., Cantoni, O., 2007. Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. *Curr. Med. Chem.* 14, 1940–1944.
- Mateu, A., Ramudo, L., Manso, M.A., Closa, D., De Dios, I., 2014. Acinar inflammatory response to lipid derivatives generated in necrotic fat during acute pancreatitis. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1879–1886.
- Mayer, J., Rau, B., Grewe, M., Schoenberg, M.H., Nevalainen, T.J., Beger, H.G., 1998. Secretory phospholipase A2 in patients with infected pancreatic necroses in acute pancreatitis. *Pancreas* 17, 272–277.
- McGettrick, A.F., O'Neill, L.A., 2004. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol. Immunol.* 41, 577–582.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway Jr., C.A., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.
- Nguyen, M.T., Chen, A., Lu, W.J., Fan, W., Li, P.P., Oh, D.Y., et al., 2012. Regulation of chemokine and chemokine receptor expression by PPARgamma in adipocytes and macrophages. *PLoS ONE* 7, e34976.
- Pereda, J., Sabater, L., Cassinello, N., Gomez-Cambronero, L., Closa, D., Folch-Puy, E., et al., 2004. Effect of simultaneous inhibition of TNF-alpha production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases. *Ann. Surg.* 240, 108–116.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., et al., 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085–2088.
- Ramnath, R.D., Sun, J., Adhikari, S., Bhatia, M., 2007. Effect of mitogen-activated protein kinases on chemokine synthesis induced by substance P in mouse pancreatic acinar cells. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 1326–1341.
- Ramudo, L., Yubero, S., Manso, M.A., Vicente, S., De Dios, I., 2009. Signal transduction of MCP-1 expression induced by pancreatitis-associated ascitic fluid in pancreatic acinar cells. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 1314–1320.
- Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K., 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79–82.
- Sawa, H., Ueda, T., Takeyama, Y., Yasuda, T., Shinzeki, M., Nakajima, T., et al., 2007. Role of Toll-like receptor 4 in the pathophysiology of severe acute pancreatitis in mice. *Surg. Today* 37, 867–873.
- Sha, T., Sunamoto, M., Kitazaki, T., Sato, J., Ii, M., Iizawa, Y., 2007. Therapeutic effects of TAK-242, a novel selective Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, in mouse endotoxin shock model. *Eur. J. Pharmacol.* 571, 231–239.
- Sharif, R., Dawra, R., Wasiluk, K., Phillips, P., Dudeja, V., Kurt-Jones, E., et al., 2009. Impact of toll-like receptor 4 on the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury in mice. *Gut* 58, 813–819.
- Shiose, A., Sumimoto, H., 2000. Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 275, 13793–13801.
- Sun, L.K., Reding, T., Bain, M., Heikenwalder, M., Bimmler, D., Graf, R., 2007. Prostaglandin E2 modulates TNF-alpha-induced MCP-1 synthesis in pancreatic acinar cells in a PKA-dependent manner. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G1196–G1204.
- Sztefko, K., Panek, J., 2001. Serum free fatty acid concentration in patients with acute pancreatitis. *Pancreatol.* 1, 230–236.
- Valdearcos, M., Esquinas, E., Meana, C., Pena, L., Gil-de-Gomez, L., Balsinde, J., et al., 2012. Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *J. Biol. Chem.* 287, 10894–10904.
- Volpe, C.M., Nogueira-Machado, J.A., 2013. The dual role of free fatty acid signaling in inflammation and therapeutics. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* 7, 189–197.
- Wan, H., Yuan, Y., Qian, A., Sun, Y., Qiao, M., 2008. Pioglitazone, a PPARgamma ligand, suppresses NFkappaB activation through inhibition of IkappaB kinase activation in cerulein-treated AR42J cells. *Biomed. Pharmacother.* 62, 466–472.
- Weatherill, A.R., Lee, J.Y., Zhao, L., Lemay, D.G., Youn, H.S., Hwang, D.H., 2005. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J. Immunol.* 174, 5390–5397.
- Wong, S.W., Kwon, M.J., Choi, A.M., Kim, H.P., Nakahira, K., Hwang, D.H., 2009. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 284, 27384–27392.
- Xu, P., Xu, K., Wang, J., Jiang, J.P., Chen, L.Q., 2011. Pioglitazone: a promising therapeutic tool in sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 56, 1082–1089.
- Yano, M., Matsumura, T., Senokuchi, T., Ishii, N., Murata, Y., Taketa, K., et al., 2007. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ. Res.* 100, 1442–1451.
- Yeop Han, C., Kargi, A.Y., Omer, M., Chan, C.K., Wabitsch, M., O'Brien, K.D., et al., 2010. Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation. *Diabetes* 59, 386–396.
- Yubero, S., Ramudo, L., Manso, M.A., De Dios, I., 2009a. Mechanisms of dexamethasone-mediated chemokine down-regulation in mild and severe acute pancreatitis. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 1205–1211.
- Yubero, S., Ramudo, L., Manso, M.A., De Dios, I., 2009b. The role of redox status on chemokine expression in acute pancreatitis. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 148–154.
- Zhang, X., Tian, H., Wu, C., Ye, Q., Jiang, X., Chen, L., et al., 2009. Effect of baicalin on inflammatory mediator levels and microcirculation disturbance in rats with severe acute pancreatitis. *Pancreas* 38, 732–738.

