

————— *Artículo original* —————

## **Regulación epigenética en la pancreatitis necrótica aguda**

Recibido el 14 de febrero de 2007

JUAN SANDOVAL<sup>1</sup>, JAVIER PEREDA<sup>2</sup>, JOSÉ LUIS  
RODRIGUEZ<sup>1</sup>, JUAN SASTRE<sup>2</sup>, GERARDO LÓPEZ RODAS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y*

<sup>2</sup>*Departamento de Fisiología, Universitat de Valencia  
46100 Burjassot (Valencia)*

### **RESUMEN**

La pancreatitis necrótica aguda (PA) produce, en casos graves, una severa necrosis a nivel local, múltiples complicaciones sistémicas y elevada mortalidad. En este trabajo hemos analizado el complejo y ordenado perfil temporal de expresión de los genes más importantes relacionados con el inicio de la PA inducida por taurocolato en rata. Entre éstos se incluyen genes que codifican factores de transcripción (como *egr-1*), rutas de señalización intracelular, moléculas de adhesión (como *icam-1*), citoquinas (como *tnf $\alpha$* ) y genes de estrés oxidativo. El análisis de los mecanismos epigenéticos de regulación en tres genes modelo (*egr-1*, *icam-1* y *tnf $\alpha$* ) muestra la intervención de diferentes factores de transcripción pro-inflamatorios (EGR-1, ATF-2, NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  o SP1), la unión de los complejos HAT (CBP) y liberación de complejos HDAC (HDAC1/2-Sin3A-) y la modificación de residuos específicos de histonas (H3K9ac, H3K14ac, H4K5ac y H3K4me<sub>3</sub>). Por otra parte, el estudio del mecanismo de acción del potencial fármaco terapéutico pentoxifilina mostró que su efecto beneficioso puede ser producido, en parte, por represión de diversos genes, en especial *egr-1*, *icam-1* y *tnf $\alpha$* , regulando la unión a sus promotores de factores transcripcionales pro-inflamatorios (NF- $\kappa$ B, SP1, C/EBP $\beta$  y EGR-1) y la inhibición de las rutas de señalización de ERK1/2 y JNK1/2 implicadas en la activación de estos genes. Estos resultados avalan el posible uso terapéutico

---

\* Autor para correspondencia: Gerardo López Rodas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. C/ Doctor Moliner, 50. 46100 Burjassot (Valencia). Teléfono: 96 354 48 67. Fax: 96 354 46 35; e-mail: gerardo.lopez@uv.es

de la pentoxifilina en las fases iniciales de la PA, o como tratamiento preventivo, al bloquear los estímulos pro-inflamatorios característicos de la PA.

**Palabras clave:** ChIP.—HAT/HDAC.—Cromatina.—Modificación de histonas.—Inflamación.

## ABSTRACT

### Epigenetic regulation during acute necrotic pancreatitis.

The acute necrotic pancreatitis (AP) produces, in serious clinical cases, a severe local necrosis, develops several systemic complications and elevate mortality. In the present work we analysed the complex and ordered temporal profile of gene expression of the most important genes related with the initiation of AP induced by taurocholate in rat. They include genes coding for transcriptional factors (f.i. *egr-1*), intracellular signalling network, adhesion molecules (f.i. *icam-1*), cytokines (f.i. *tnf $\alpha$* ) and oxidative stress genes. The analysis of regulation epigenetic mechanisms in three model genes (*egr-1*, *icam-1* y *tnf $\alpha$* ) showed the involvement of different pro-inflammatory transcriptional factors (EGR-1, ATF-2, NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  or SP1), binding of HAT complexes (CBP) and release of HDAC complexes (HDAC1/2-Sin3A-) and site-specific histone modification (H3K9ac, H3K14ac, H4K5ac y H3K4me<sub>3</sub>). Furthermore, the study of the mechanism of action of the potentially pharmacological agent pentoxifylline showed that beneficial effect may be produced, at least partially, by repression of different genes, specially *egr-1*, *icam-1* and *tnf $\alpha$* , throughout regulation of pro-inflammatory transcriptional factors binding (NF- $\kappa$ B, SP1, C/EBP $\beta$  or EGR-1) and inhibition of signalling network ERK1/2 and JNK1/2 involved in the activation of those genes. The results support the potential therapeutic use of pentoxifylline in the initial phases of AP, or as preventive treatment, since it blocks the pro-inflammatory stimulus generated in AP.

**Key words:** ChIP.—HAT/HDAC.—Chromatin.—Histone modification.—Inflammation.

## INTRODUCCIÓN

La pancreatitis aguda (PA) es una enfermedad cuya incidencia se ha incrementado notablemente durante las últimas décadas. Hoy en día implica alrededor del 3% de los pacientes ingresados en los grandes hospitales, presentando una importante tasa de complicaciones y, lo que es más importante, una mortalidad considerable (1). A pesar de que existen diferentes hipótesis acerca de los sucesos tempranos en la PA, hoy en día se acepta que el principal desencadenan-

te es el daño y la eventual muerte de las células pancreáticas. Esto implica la activación de mediadores de la inflamación que activan la respuesta inflamatoria local y en un porcentaje de los pacientes desencadena el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y, si éste persiste, el síndrome de disfunción multiorgánica (MODS).

Ensayos clínicos en humanos han permitido estudiar estos mediadores de la inflamación, clasificándose en: componentes celulares (macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, etc.), mediadores de origen celular (citoquinas, estrés oxidativo, etc.) y de origen humoral (complemento, etc.) (2). Los mediadores de la inflamación serían el nexo de unión entre la lesión local del páncreas y los efectos sistémicos descritos en la PA, igual que en otros procesos de inflamación sistémica como la sepsis, grandes quemados, etc. Entre los procesos que regulan los macrófagos, neutrófilos y células endoteliales se encuentran la activación de diferentes células inmunológicas, liberación de gran cantidad de mediadores proinflamatorios ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6) que extienden y amplifican la señal inflamatoria (3).

Gran parte de las investigaciones indican que la severidad de la pancreatitis y la afectación pulmonar resultan de un desequilibrio entre los mediadores pro-inflamatorios y los anti-inflamatorios (4). Entre los principales mediadores pro-inflamatorios destacan las citoquinas  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y el factor activador de plaquetas (PAF). Por otro lado, los mediadores anti-inflamatorios son esencialmente IL-10, IL-4. Desafortunadamente, a pesar de las evidencias que indican un papel principal de las citoquinas en el desarrollo de la PA, la inhibición de estas moléculas en diversos ensayos clínicos han proporcionado resultados desesperanzadores.

En la última década, el conocimiento de los mecanismos moleculares epigenéticos de la regulación génica se ha erigido como un campo de investigación cuyo desarrollo puede conducir a la aparición de nuevas estrategias terapéuticas para paliar ciertos procesos patológicos. La PA se caracteriza, en sus etapas iniciales, por el desarrollo de un poco conocido programa de regulación de la expresión génica que pone en marcha la respuesta inflamatoria local y sistémica. Sin embargo, un análisis detallado de los mecanismos epigenéticos que gobiernan estas etapas iniciales de la PA no ha sido llevado a cabo hasta la fecha.

Este trabajo ha consistido justamente en intentar conocer los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión génica durante la PA y el análisis del posible mecanismo de acción de un potencial agente terapéutico para la PA, la pentoxifilina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Animales de experimentación

Los animales de experimentación utilizados en este trabajo fueron ratas Wistar macho jóvenes de 250 a 350 g de peso corporal. El modelo de pancreatitis aguda necrótica utilizado ha sido el de infusión retrógrada de taurocolato sódico al 3,5% (Sigma) a un ritmo de 0,1 mL/100 g de peso del animal durante un minuto. Para el grupo de animales tratados con pentoxifilina, ésta se administra mediante perfusión intravenosa inmediatamente después de la inducción con taurocolato. Para el grupo SHAM se administra suero fisiológico (NaCl al 0,9%). La manipulación de los animales y los protocolos de experimentación han sido realizados de acuerdo con los criterios resaltados por la «Guía para el cuidado de animales de experimentación» (National Institutes of Health, publicación 86-23 revisada 1985).

### 2. Inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP)

Este método fue adaptado a nuestro tejido a partir del protocolo descrito por Borrás *et al.* (5) y Sandoval *et al.* (6). De forma resumida, las muestras de tejido pancreático, aisladas de la región de la cabeza del páncreas, se entrecruzan en formaldehído al 1% durante 10 minutos. La reacción se detiene por adición de glicina a una concentración final de 0,125M. A continuación se aísla la cromatina y se fragmenta por sonicación hasta obtener un rango de distribución de tamaños de cromatina desde 400 pb a 600 pb. La muestra, con aproximadamente 50 µg de DNA para cada inmunoprecipitación, se incuba con 30 µL de proteína A+G-sefarosa prebloqueada, y posteriormente se incuban durante 16 horas con el anticuerpo correspondiente, excepto una muestra que es tratada de forma similar

a la que no se le añade anticuerpo (No Ab). A continuación, las muestras se incuban con 50  $\mu$ L de proteína A+G-sefarosa, se lava y se desentrecruza durante toda la noche. Por último se purifica el DNA con el *PCR purification Kit* (Quiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacena a  $-20^{\circ}$  C hasta su análisis por PCR. Los oligonucleótidos usados para las PCR fueron: *egr1* (promotor): 5'-GTAGAACCCCGGCCTGACTC-3' y 5'-AGGCTCCTGGAGTTCCCAGC-3'; *egr1* (zona codificable): 5'-CTTGCCCTGTTGAGTCCTGC-3' y 5'-CACAGGCAAAGGCTTCTCG-3'; *icam1* (promotor): 5'-GGGATGGCCGTCCTGACTA-3' y 5'-GCCACTTCCCAGAAACCT-3'; *icam1* (zona codificable): 5'-TGTCGGTGCTCAGGTATCCA-3' y 5'-TTCACCTGCACGGATCCA-3'; *tnf $\alpha$*  (promotor): 5'-GGTGAGGACGGAGAGGAGATT-3' y 5'-TGGGAGTTAGTACCAGGGTGTTC-3'; *tnf $\alpha$*  (zona codificable): 5'-CAGCCGATTTGCCATTTTCAT-3' y 5'-TCCTTAGGGCAAGGGCTCTT-3';  $\beta$ -actina (promotor): 5'-GCCGTTCCGAAATTGCCT-3' y 5'-ACGTCCTGCTTACCTGGTG-3';  $\beta$ -actina (zona codificable): 5'-AGAGCAAGAGAGGCATCCTG-3' y 5'-GGGTCATCTTTTCACGGTTGG-3';  $\alpha$ -actina (promotor): 5'-AGGGACTCTAGTGCCCAACACC-3' y 5'-CCCACCTCCACCCTACCTGC-3';  $\alpha$ -actina (zona codificable): 5'-AGGATTCCTACGTGGGCGAC-3' y 5'-AGAGAGACAGCACC GCCTG-3'; Región intergénica 5'-TGCCGGTTATCACTCTCTCATGC-3' 5'-GGTCTTGTTTCAGTCTTCACATGC-3'.

### 3. Aislamiento y análisis de RNA

La extracción de RNA total de tejido pancreático se realizó utilizando *RNA later* (Ambion) cuya función es estabilizar el RNA. La extracción total de RNA se lleva a cabo mediante el Kit *mini RNA total extraction* (Quiagen) según las indicaciones del fabricante. El cDNA de las muestras se amplifica por PCR utilizando los oligonucleótidos de la región codificable de los genes de interés. Las reacciones de PCR cuantitativo en *tiempo real* de las muestras de cDNA se realizaron en termociclador *ABI GeneAmp 7000 Sequence Detection System* (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) usando como agente fluorescente *Syber Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems)*. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado y las curvas de fusión se construyeron mediante el programa *Dissociation Curves software* (Applied Biosystems), para asegurar que sólo se amplifica

un único producto de PCR. Como control de carga se analiza el gen *rRNA 18S*.

## RESULTADOS

### 1. Rastreo de genes diana

El estudio de los mecanismos de regulación génica durante la PA se ha iniciado con un rastreo y la selección de los genes potencialmente implicados en este proceso patológico. Estudios previos con microarrays procedentes de dos grupos independientes (7-8), y un estudio detallado en nuestro laboratorio de la cinética de expresión de gran cantidad genes (datos no mostrados), evidenciaron la existencia de diferentes patrones de expresión temporales para los genes estudiados. En base a su implicación en la PA demostrada por estudios con ratones *knock out* (8-9), a su perfil temporal y grado de expresión hemos seleccionado, para estudiar los mecanismos epigenéticos de regulación, los genes *egr-1* (*early growth response gene*) (8) como ejemplo de genes inmediato-tempranos, *icam-1* (*intercelular adhesion molecule 1*) (10) como ejemplo de genes tempranos, y *tnf- $\alpha$*  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) (9) como ejemplo de genes tardíos.

### 2. Estudio de las modificaciones de histonas

Entre los mecanismos epigenéticos de regulación de la actividad de la cromatina destaca el de las modificaciones postraduccionales de las histonas. Así pues, se caracterizó el patrón de modificaciones de las histonas en los promotores de los genes seleccionados y se correlacionó con la activación transcripcional durante la PA. Se seleccionaron para este estudio anticuerpos asociados a activación transcripcional, y en algún caso a represión en mamíferos. Fundamentalmente se ha analizado las acetilaciones de las histonas (anticuerpos  $\alpha$ -H3K9ac,  $\alpha$ -H3K14ac,  $\alpha$ -H3K18ac,  $\alpha$ -H3K23ac,  $\alpha$ -H3K27ac,  $\alpha$ -H4K5ac,  $\alpha$ -H4K8ac y  $\alpha$ -H4K16ac), algunas metilaciones ( $\alpha$ -H3K4me<sub>2</sub>,  $\alpha$ -H3K4me<sub>3</sub>,  $\alpha$ -H3K9me<sub>2</sub> y  $\alpha$ -H3R17me<sub>2</sub>) y la fosforilación de la ser10 de H3 ( $\alpha$ -H3S10ph-K14ac) implicadas todas ellas en la regulación transcripcional.

En la Figura 1 se evalúan mediante ChIP las variaciones en las modificaciones de histonas en los promotores de *egr-1*, *icam-1* y *tnf-α* y del gen de la  $\alpha$ -actina como control negativo. Adicionalmente, se analizó el patrón de modificación de histonas en una región intergénica que no mostraría alteración durante la inducción de la PA.

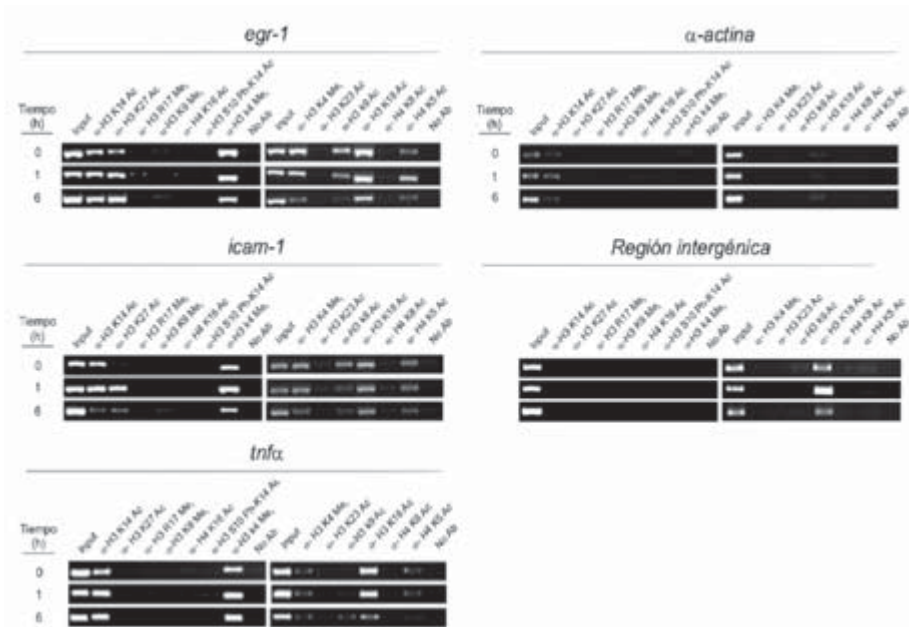


FIGURA 1. **Modificaciones postraduccionales de las histonas en los promotores de *egr-1*, *icam-1* y *tnf-α*.** Las muestras de cromatina entrecruzada a los tiempos indicados de inducción de PA fueron procesadas e inmunoprecipitadas con los anticuerpos:  $\alpha$ -H3K14ac,  $\alpha$ -H3K27ac,  $\alpha$ -H3R17me<sub>2</sub>,  $\alpha$ -H3K9me<sub>2</sub>,  $\alpha$ -H4K16ac,  $\alpha$ -H3S10Ph -K14ac,  $\alpha$ -H3K4me<sub>3</sub>,  $\alpha$ -H3K4me<sub>2</sub>,  $\alpha$ -H3K23ac,  $\alpha$ -H3K9ac,  $\alpha$ -H3K18ac,  $\alpha$ -H4K8ac,  $\alpha$ -H4K5ac,  $\alpha$ -H3K27ac y sus controles sin anticuerpo (NA) correspondientes. Las muestras Input e inmunoprecipitadas (IP) fueron analizadas por PCR utilizando oligonucleótidos de los promotores de los genes analizados. El gen de la  $\alpha$ -actina y una región intergénica se utilizan como controles negativos.

Una visión general de los datos de modificaciones de histonas indica que la totalidad de los genes seleccionados muestran la existencia e incremento de las marcas asociadas a activación transcripcional durante la PA. En concreto, se puede correlacionar la inducción génica con el enriquecimiento de las marcas específicas, como H3K4me<sub>3</sub>, H3K9ac H4K5ac o H4K8ac (12-14). Por otro lado, la marca asociada

a represión transcripcional y heterocromatina, la dimetilación de la lisina 9 en H3 (H3K9me<sub>2</sub>) (15) está ausente en los genes seleccionados. Estos datos implican que la cromatina de estos genes no se encuentra en una estructura de heterocromatina, sino en una estructura compatible con la de *genes potencialmente activos* capaces de responder rápidamente a un estímulo como la propia PA.

### 3. Unión de complejos modificadores de la cromatina

Los complejos HAT y HDAC son las enzimas encargadas de modular el nivel de acetilación en las histonas actuando en general como activadores (HAT) o inhibidores (HDAC) de la expresión génica. En este trabajo se ha analizado el coactivador transcripcional CBP que posee actividad HAT, y un complejo con actividad HDAC, denominado Sin3A que media en la represión de diferentes contextos transcripcionales (16).

Para conocer la posible implicación de CBP y Sin3A en la regulación transcripcional de los genes en nuestro modelo, se estudió la unión de estos complejos a los promotores de los genes estudiados a tiempos de 0, 1, 3 y 6 horas tras la inducción de la PA (Figura 2). Los perfiles de unión del coactivador CBP coinciden de modo notable con el correspondiente perfil temporal (*inmediato-temprano, temprano o tardío*) de expresión de cada gen. Por su parte, el complejo sin3A no se encuentra unido en ninguno de los promotores estudiados a excepción del gen *icam-1* en donde su patrón de unión es inverso al de CBP, aumentando así el nivel de acetilación en el promotor y activando el gen.

### 4. Unión de factores transcripcionales

Un análisis bioinformático TRANSFAC (datos no mostrados) permitió identificar los sitios de unión potenciales para factores transcripcionales en los promotores de los genes seleccionados. El promotor de *egr-1* de rata presenta elementos de respuesta al suero (SRE), cuya funcionalidad depende de los factores transcripcionales SRF y ELK-1, un sitio de respuesta a AMP cíclico (CRE) al que se



une el factor CREB, así como sitios para NF- $\kappa$ B y Sp1. Es de destacar la presencia de sitios de unión para el propio EGR-1 solapantes con los de SP1 (17). En cuanto al promotor del gen *icam-1*, la funcionalidad de algunos de los sitios de unión ha sido destacada en modelos biológicos diferentes al de rata. Así, se ha demostrado en humanos que los elementos de respuesta a las citoquinas pro-inflamatorias se encuentran en el promotor en una región próxima al inicio de transcripción (18). En el promotor de *tnf- $\alpha$*  existe una región que comprende desde -200 pb hasta el inicio de transcripción aparecen las secuencias de unión para SP1, AP-1, ETS/ELK-1, NF- $\kappa$ B, CREB, C/EBP $\beta$  y EGR-1/SP1 (19).

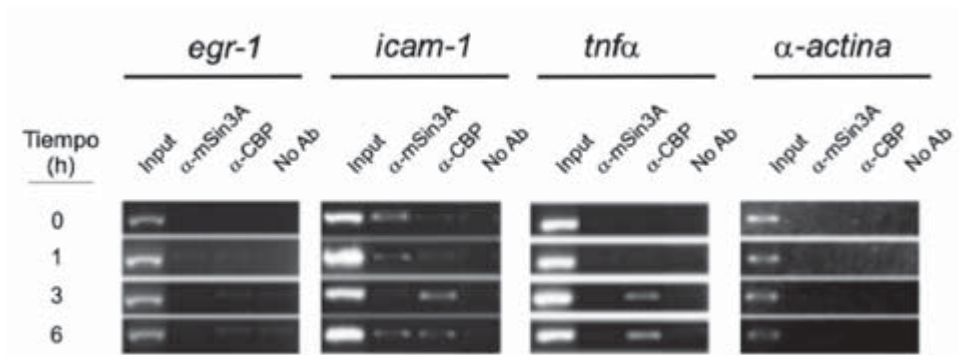


FIGURA 2. **Unión de complejos histona acetiltransferasas (HAT) e histona desacetilasas (HDAC) en los promotores de *egr-1*, *icam-1* y *tnf- $\alpha$* .**

Las muestras de cromatina entrecruzada a los tiempos indicados de inducción de PA fueron procesadas e inmunoprecipitadas con los anticuerpos:  $\alpha$ -SIN3A,  $\alpha$ -CBP y sus controles sin anticuerpo (NA). El gen de la  $\alpha$ -actina se utiliza como control negativo.

La unión de estos factores transcripcionales al promotor de los genes seleccionados fue estudiada mediante la técnica ChIP con anticuerpos frente a los diferentes factores transcripcionales (Figura 3).

En el promotor de *egr-1*, ELK1 se encuentra permanentemente unido al promotor (Figura 3) y su posible contribución a la regulación de *egr-1* podría ejercerse mediante fosforilación de dicho factor como sugieren p.e. (20-21). SP1 y EGR-1 manifiestan perfiles de unión opuestos (Figura 3), resultado que es consistente con la idea

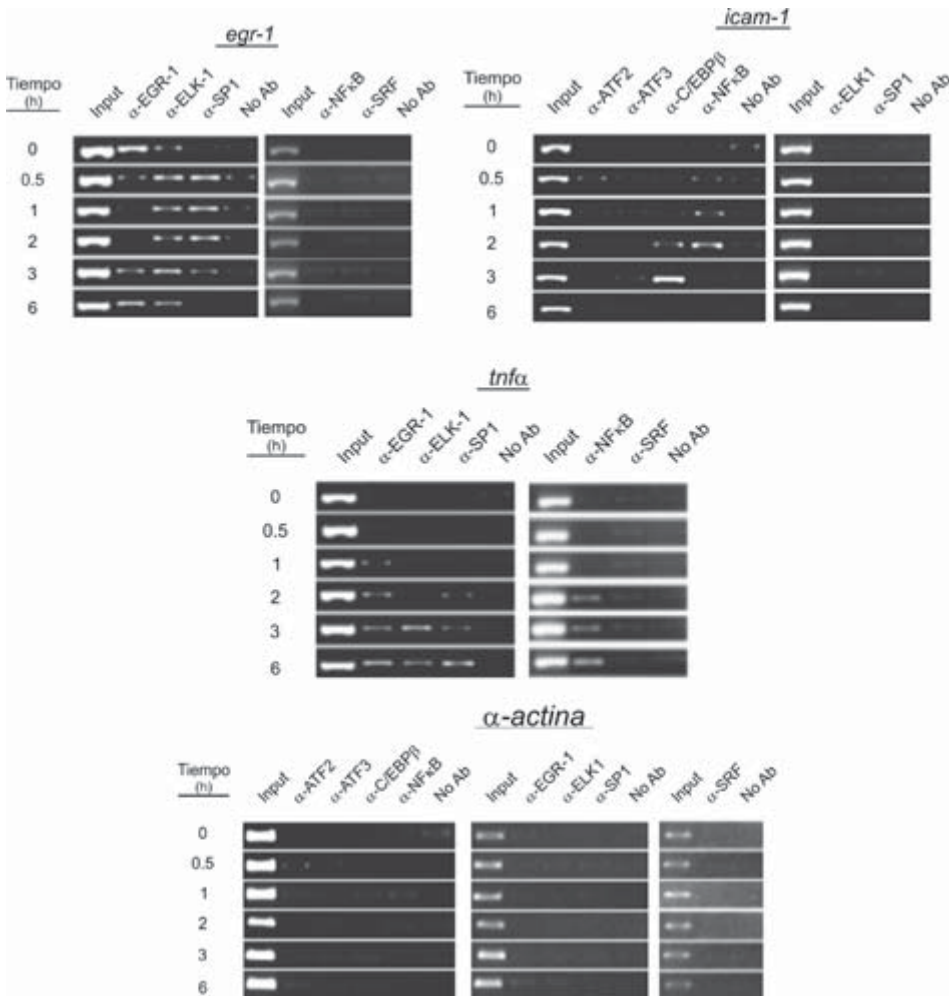


FIGURA 3. **Unión de factores transcripcionales al promotor de *egr-1*, *icam-1* y *tnf- $\alpha$* .** Las muestras de cromatina entrecruzada a los tiempos indicados de inducción de PA fueron procesadas e inmunoprecipitadas con los diferentes anticuerpos. Las muestras Input e IP se analizan por PCR con los cebadores del promotor del gen.

de que EGR-1 competiría con SP1 (17, 22) desplazándolo de los sitios ricos en G+C como un mecanismo para inhibir la actividad de SP1. Por otro lado, NF- $\kappa$ B y C/EBP $\beta$  se unen al promotor de *icam-1* de modo secuencial y su unión es compatible con la inducción de la ex-

presión de este gen (Figura 3). Por último, en el promotor de *tnf- $\alpha$*  se unen los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B, EGR-1, SRF, ELK-1 y SP1 (Figura 3) consistente con la existencia de un enhanceosoma que regula la expresión de este gen y cuya composición depende del tipo celular, del estado de diferenciación y del estímulo que inicia la activación génica (23).

## 5. Mecanismo de acción del agente terapéutico pentoxifilina

La pentoxifilina, un derivado de la metilxantina, posee propiedades anti-inflamatorias (24) a través de la inhibición de la producción de citoquinas como TNF $\alpha$  e IL-2 y que se ha asociado a la reducción de la severidad de la PA (25). En base a estos resultados fue tentador conocer si la pentoxifilina es capaz de reducir la severidad de esta patología por medio de la inhibición de la expresión de los genes seleccionados en nuestro estudio implicados en las fases iniciales del desarrollo de la PA. Los resultados de la Figura 4, obtenidos a partir de ratas tratadas con pentoxifilina 30 minutos antes de la inducción de la PA, muestran que en general la expresión de los genes analizados se encuentra reducida en las muestras tratadas con pentoxifilina. El gen *inmediato-temprano*, *egr-1*, presenta una notable reducción a 1 hora, en *icam-1*, aunque su inducción es mínima a este tiempo, se observa también una reducción considerable y, en el gen *tardío* *tnf- $\alpha$*  la reducción de la expresión debida al inhibidor es especialmente drástica a las 6 horas de inducción.

Para ahondar en el conocimiento acerca del mecanismo molecular de acción de la pentoxifilina hemos estudiado su efecto sobre la unión de los factores de transcripción al promotor de los genes implicados en la PA. El análisis se efectuó por la técnica ChIP usando los anticuerpos contra los factores que regulan los genes pro-inflamatorios como EGR-1, C-JUN, SP1, NF- $\kappa$ B y C/EB $\beta$ . En el promotor del gen *egr-1* (Figura 5), a 1 hora de inducción en la muestra tratada con pentoxifilina (T+P 1 hora) la unión del factor SP1 es significativamente menor que el control no tratado (T 1 hora) a 0 y 6 horas de inducción de la PA. Estos datos indican que la reducción de la unión de SP1, asumiendo un papel activador de éste, podría ser un posible mecanismo por el cual la pentoxifilina reprime parcial-

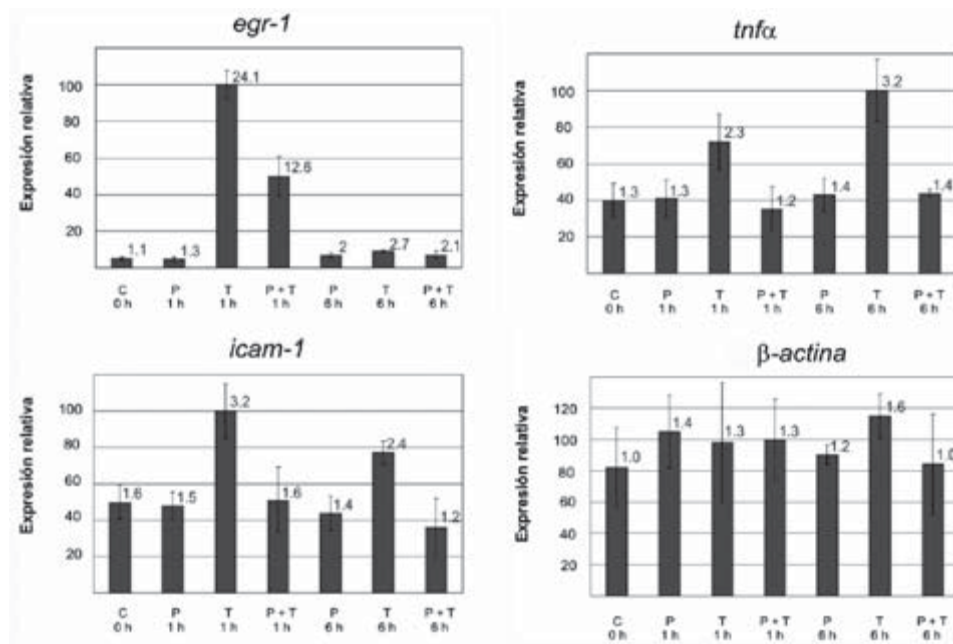


FIGURA 4. **Efecto de la pentoxifilina sobre la expresión de *egr-1*, *icam-1* y *tnf-α*.** Las muestras, analizadas por RT-PCR cuantitativa, se identifican como C: control no tratado; T: taurocolato 3,5%; P+T: pentoxifilina + taurocolato 3,5%. Los valores fueron normalizados respecto al gen rRNA 18S y referidos a la muestra con valor máximo y a la que se le asigna el valor arbitrario de 100%. Los valores sobre los histogramas representan el grado de inducción real respecto al control 0 horas. El gen de la β-actina se utiliza como control positivo por su expresión constitutiva.

mente a *egr-1*. El factor NF-κB en la muestra tratada con pentoxifilina no aparece unido al promotor de *icam-1* (T+P 1 hora), a diferencia del control no tratado (T 1 hora), por lo que el mecanismo de acción de la pentoxifilina en la represión de este gen durante la PA debe ser dependiente de NF-κB (Figura 5). En el promotor de *tnf-α* la represión del gen *tnf-α* dependiente de pentoxifilina parece estar mediada a tiempos iniciales por EGR-1 y, a tiempos tardíos, fundamentalmente por NF-κB y en menor medida por C/EBPβ (Figura 5). Como control negativo utilizamos el promotor del gen α-actina que no se expresa en el páncreas.

El análisis de los resultados de este estudio *in vivo* de la acción de la pentoxifilina en la disminución de la severidad de la PA permi-

te apuntar ciertas ideas. El efecto beneficioso del agente terapéutico en la PA puede ser producido, en parte, por la represión de los genes seleccionados en este estudio mediada por la regulación de la unión de factores transcripcionales pro-inflamatorios, principalmente NF- $\kappa$ B y SP1 y, en menor medida, C/EBP $\beta$  y EGR-1, así como la inhibición de las rutas MAP quinasas ERK y JNK (datos no mostrados). Estos resultados son compatibles con trabajos publicados que describen una acción anti-inflamatoria de este agente a través de la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias (26-27).

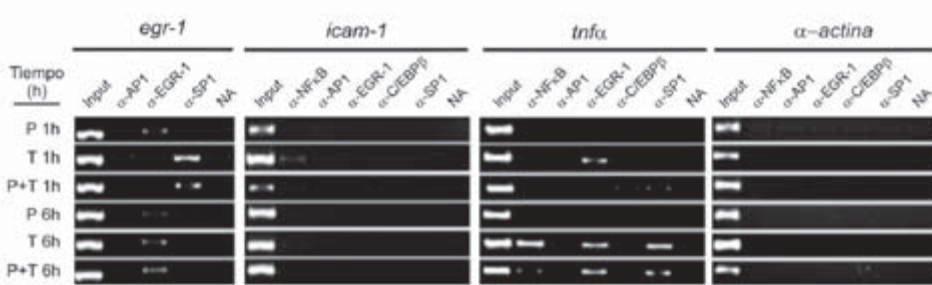


FIGURA 5. *Efecto de la pentoxifilina sobre la unión de factores en los promotores de egr-1, icam-1 y tnfa- $\alpha$ . Las muestras de cromatina entrecruzada a los tiempos indicados de inducción de PA, en presencia o no de pentoxifilina, fueron procesadas e inmunoprecipitadas con los anticuerpos:  $\alpha$ -NF $\kappa$ B,  $\alpha$ -API,  $\alpha$ -EGR-1,  $\alpha$ -C/EBP $\beta$ ,  $\alpha$ -SP1 y sus controles sin anticuerpo (NA) correspondientes. Las muestras se identifican como C: control no tratado; T: taurocolato 3,5%; P+T: pentoxifilina + taurocolato 3,5%. Como control negativo se utiliza el gen de la  $\alpha$ -actina.*

## DISCUSIÓN

Se han propuesto diferentes teorías para explicar la fisiopatología de la PA. En la actualidad se acepta que el origen de esta patología es el resultado de un proceso local de autodigestión del páncreas generado por la activación de sus propias enzimas, en especial del tripsinógeno (28). Mientras que los leucocitos, macrófagos y mediadores químicos de la inflamación son elementos clave que convierten las señales iniciadas por las lesiones locales del páncreas en un proceso sistémico sobre otros órganos (29).

En nuestro trabajo hemos mostrado que el daño inicial en células acinares activa un severo y estricto programa de señalización que regula la expresión de genes implicados en la PA. En este sentido hemos detallado el complejo y ordenado perfil temporal de los genes más importantes relacionados con el inicio de la PA y que han ampliado los estudios previos en humanos y en animales (30-31). Entre estos se incluyen factores de transcripción, rutas de señalización intracelular, citoquinas, moléculas de adhesión y genes de estrés oxidativo.

La inducción de la expresión génica requiere la activación de determinados factores transcripcionales, como NF- $\kappa$ B (32-33), AP-1 (34) o EGR-1 (8), en el páncreas durante el desarrollo de la PA. Sin embargo, hasta la fecha no se habían caracterizado *in vivo* los mecanismos por los cuales la estructura de la cromatina constituye un factor decisivo en la regulación de los promotores de los genes implicados en la PA. El análisis *in vivo* de los promotores de los genes *egr-1* (*inmediato-temprano*), *icam-1* (*temprano*) y *tnf- $\alpha$*  (*tardío*) han mostrado la participación de diferentes factores de transcripción (EGR1, ATF2, ELK1, NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  y SP1), la unión de la histona acetiltransferasas CBP y un aumento de las acetilaciones de histonas en la regulación de la cromatina en los diferentes promotores durante la activación génica correspondiente.

El análisis temporal de los mecanismos epigenéticos de regulación de la cromatina, en concreto las modificaciones de las histonas y la unión de complejos HAT, HDAC y remodeladores, permiten proponer modelos de activación transcripcional para estos genes. De modo general, la disociación de las HDAC es concomitante con la unión de HAT, lo cual genera un aumento de la acetilación de las histonas lo que facilita el acceso de factores de transcripción y de la maquinaria transcripcional. Diversos trabajos han aplicado estrategias similares para conocer los mecanismos de regulación de diferentes genes, como *nos-2* (35), *igf2r* (36) o *E-selectina* (37). Un aspecto a destacar es que nuestros resultados parecen compatibles con la idea del *código de histonas* en que se sugería que la sucesión y combinación de las modificaciones de las histonas en el promotor de un gen determinan su respuesta a un estímulo específico (11).

Se ha descrito recientemente que la administración *in vivo* de pentoxifilina en un modelo de PA leve inducida por ceruleína (38) y

en un modelo de PA grave inducida por taurocolato (24) se asocia con una disminución de los parámetros asociados a la PA. Sin embargo, el mecanismo de acción de este compuesto no estaba bien caracterizado a nivel molecular. En el presente trabajo hemos puesto de manifiesto que la administración de pentoxifilina en ratas con PA inducida por taurocolato es capaz de inhibir la activación de las rutas de quinasas (datos no mostrados). En base a estos datos, parecía de enorme interés analizar si el efecto beneficioso de este compuesto es producido, en parte, por la represión de los genes implicados en el desarrollo de la PA. Los estudios de expresión realizados mostraron que, en efecto, la pentoxifilina inhibía parcialmente la activación de muchos de los genes diana seleccionados. Por tanto, para profundizar en dichos estudios analizamos su acción sobre la unión de factores de transcripción en los promotores de los genes, mostrándose una reducción notable de dicha unión, en especial en el caso de los factores NF $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  y SP1. Estos resultados son compatibles con trabajos publicados que describen una acción anti-inflamatoria de este agente a través de la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias (26-27).

Los resultados sugieren por tanto que la pentoxifilina debe ejercer su acción inhibitoria en una etapa inicial de la ruta de transducción de señal activadora del taurocolato. Por tanto, nuestros resultados apoyan el uso de la pentoxifilina como agente terapéutico en fases iniciales de la PA, al reducir la expresión de los genes pro-inflamatorios estudiados, o su uso preventivo en pacientes con riesgo de padecerla por ejemplo al someterse a una colangiopancreatografía, prueba de diagnóstico que presenta como efecto secundario el desarrollo de una posible PA.

### **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido financiado por las ayudas a la investigación concedidas a G. López-Rodas por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-03616) y por la Consellería de Empresa, Universitat i Ciencia de la Generalitat Valenciana (ACOMP 06/132).

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) BANKS, P. A. (2002): Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. *Gastrointest. Endosc.* 56: S226-230.
- (2) WILSON, P. G.; MANJI, M. and NEOPTOLEMOS, J. P. (1998): Acute pancreatitis as a model of sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.* 41 Suppl A, 51-63.
- (3) NORMAN, J. G.; FINK, G. W. and FRANZ, M. G. (1995a): Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch. Surg.* 130: 966-970.
- (4) BHATIA, M. and MOOCHHALA, S. (2004): Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J. Pathol.* 202: 145-156.
- (5) BORRAS, E.; ZARAGOZA, R.; MORANTE, M.; GARCÍA, C., GIMENO, A., LÓPEZ-RODAS, G.; BARBER, T.; MIRALLES, V. J.; VINA, J. R. and TORRES, L. (2003): *In vivo* studies of altered expression patterns of p53 and proliferative control genes in chronic vitamin A deficiency and hypervitaminosis. *Eur. J. Biochem.* 270: 1493-1501.
- (6) SANDOVAL, J.; RODRÍGUEZ, J. L.; TUR, G.; SERVIDDIO, G.; PEREDA, J.; BOUKABA, A.; SASTRE, J.; TORRES, L.; FRANCO, L. and LOPEZ-RODAS, G. (2004): RNAPol-ChIP: a novel application of chromatin immunoprecipitation to the analysis of real-time gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 32: e88.
- (7) DUSETTI, N. J.; TOMASINI, R.; AZIZI, A.; BARTHET, M.; VACCARO, M. I.; FIEDLER, F.; DAGORN, J. C. and IOVANNA, J. L. (2000): Expression profiling in pancreas during the acute phase of pancreatitis using cDNA microarrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277: 660-667.
- (8) JI, B.; CHEN, X. Q.; MISEK, D. E.; KUICK, R.; HANASH, S.; ERNST, S.; NAJARIAN, R. and LOGSDON, C. D. (2003): Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator. *Physiol. Genomics.* 14: 59-72.
- (9) TRACEY, K. J. and CERAMI, A. (1994): Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* 45: 491-503.
- (10) BHATIA, M.; WONG, F. L.; CAO, Y.; LAU, H. Y.; HUANG, J.; PUNEET, P. and CHEVALI, L. (2005): Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology.* 5: 132-144.
- (11) STRAHL, B. D. and ALLIS, C. D. (2000): The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403: 41-45.
- (12) SANTOS-ROSA, H.; SCHNEIDER, R.; BANNISTER, A. J.; SHERRIFF, J.; BERNSTEIN, B. E.; EMRE, N. C.; SCHREIBER, S. L.; MELLOR, J. and KOUZARIDES, T. (2002): Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature.* 419: 407-411.
- (13) SCHNEIDER, R.; BANNISTER, A. J.; MYERS, F. A.; THORNE, A. W., CRANE-ROBINSON, C. and KOUZARIDES, T. (2004): Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell. Biol.* 6: 73-77.
- (14) GRANT, P. A.; EBERHARTER, A.; JOHN, S.; COOK, R. G.; TURNER, B. M. and WORKMAN, J. L. (1999): Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J. Biol. Chem.* 274: 5895-5900.



- (15) STEWART, M. D.; LI, J. and WONG, J. (2005): Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol. Cell. Biol.* 25: 2525-2538.
- (16) SILVERSTEIN, R. A. and EKWALL, K. (2005): Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr. Genet.* 47: 1-17.
- (17) CAO, X.; MAHENDRAN, R.; GUY, G. R. and TAN, Y. H. (1993): Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J. Biol. Chem.* 268: 16949-16957.
- (18) KACHIGIAN, L. M.; WILLIAMS, A. J. and COLLINS, T. (1995): Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270: 27679-27686.
- (19) LI, D. H.; HAVELL, E. A.; BROWN, C. L. and CULLEN, J. M. (2000): Woodchuck lymphotoxin-alpha, -beta and tumor necrosis factor genes: structure, characterization and biological activity. *Gene.* 242: 295-305.
- (20) CHEN, C. C.; LEE, W. R. and SAFE, S. (2004b): Egr-1 is activated by 17beta-estradiol in MCF-7 cells by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of ELK-1. *J. Cell. Biochem.* 93: 1063-1074.
- (21) THOTTASSERY, J. V.; SUN, D.; ZAMBETTI, G. P.; TROUTMAN, A.; SUKHATME, V. P.; SCHUETZ, E. G. and SCHUETZ, J. D. (1999): Sp1 and egr-1 have opposing effects on the regulation of the rat Pgp2/mdr1b gene. *J. Biol. Chem.* 274: 3199-3206.
- (22) KACHIGIAN, L. M.; WILLIAMS, A. J. and COLLINS, T. (1995): Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270: 27679-27686.
- (23) VASSALLI, P. (1992): The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 411-452.
- (24) WARD, A. and CLISSOLD, S. P. (1987): Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs.* 34: 50-97.
- (25) PEREDA, J.; SABATER, L.; CASSINELLO, N., GÓMEZ-CAMBRONERO, L.; CLOSA, D.; FOLCH-PUY, E.; APARISI, L.; CALVETE, J., CERDA, M.; LLEDO, S.; VINA, J. and SASTRE, J. (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.
- (26) EDWARDS, M. J.; ABNEY, D. L. and MILLER, F. N. (1991): Pentoxifylline inhibits interleukin-2-induced leukocyte-endothelial adherence and reduces systemic toxicity. *Surgery.* 110: 199-204.
- (27) SCHANDENE, L.; VANDENBUSSCHE, P.; CRUSIAUX, A.; ALEGRE, M. L.; ABRAMOWICZ, D.; DUPONT, E., CONTENT, J. and GOLDMAN, M. (1992): Differential effects of pentoxifylline on the production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. *Immunology.* 76: 30-34.
- (28) BHATIA, M.; WONG, F. L.; CAO, Y.; LAU, H. Y.; HUANG, J.; PUNEET, P. and CHEVALI, L. (2005): Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology.* 5: 132-144.
- (29) KUSSKE, A. M.; RONGIONE, A. J. and REBER, H. A. (1996): Cytokines and acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 110: 639-642.
- (30) KINGSNORTH, A. (1997): Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut.* 40: 1-4.

- (31) NORMAN, J. (1998): The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am. J. Surg.* 175: 76-83.
- (32) VAQUERO, E.; GUKOVSKY, I.; ZANINOVIC, V.; GUKOVSKAYA, A. S. and PANDOL, S. J. (2001): Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 280: G1197-G1208.
- (33) STEINLE, A. U.; WEIDENBACH, H.; WAGNER, M.; ADLER, G. and SCHMID, R. M. (1999): NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology.* 116: 420-430.
- (34) WULCZYN, F. G.; KRAPPMANN, D. and SCHEIDEREIT, C. (1996): The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J. Mol. Med.* 74: 749-769.
- (35) FISH, J. E.; MATOUK, C. C.; RACHLIS, A.; LIN, S.; TAI, S. C.; D'ABREO, C. and MARSDEN, P. A. (2005): The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J. Biol. Chem.* 280: 24824-24838.
- (36) YANG, Y.; LI, T.; VU, T. H.; ULANER, G. A.; HU, J. F. and HOFFMAN, A. R. (2003): The histone code regulating expression of the imprinted mouse *Igf2r* gene. *Endocrinology.* 144: 5658-5670.
- (37) EDELSTEIN, L. C.; PAN, A. and COLLINS, T. (2005): Chromatin modification and the endothelial-specific activation of the E-selectin gene. *J. Biol. Chem.* 280: 11192-11202.
- (38) GÓMEZ-CAMBRONERO, L. G.; SABATER, L.; PEREDA, J.; CASSINELLO, N.; CAMPS, B.; VINA, J. and SASTRE, J. (2002): Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 1: 393-403.