



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Modelos animales en Úlcera Péptica y Pancreatitis

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Septiembre 2017

Autor: Álvaro Pericás Ortiz

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor/es: Marta González Álvarez y María Isabel González Álvarez

Resumen

Introducción: La úlcera péptica y la pancreatitis son enfermedades relacionadas con el tracto digestivo, en la siguiente revisión bibliográfica se tratará de averiguar cómo los modelos preclínicos pueden ayudar a entender y mejorar nuevos tratamientos o los ya existentes.

Objetivo: Dar a conocer sus modelos animales preclínicos empleados en el desarrollo e investigación de nuevos fármacos y estrategias empleadas para combatir dichas patologías.

Metodología: Revisión bibliográfica en base de datos Mesh sobre la literatura científica relacionada con los modelos animales empleados en el estudio de la pancreatitis y la úlcera péptica.

Resultados: La inducción de las patologías fue implantada con éxito en distintos tipos de roedores, lo que fue comprobado mediante la evaluación bioquímica y fisiopatológica de la enfermedad estudiada.

Conclusiones: Los modelos de experimentación animales, son una manera eficaz para el estudio de la úlcera péptica y de la pancreatitis, ya que estos modelos pueden ser extrapolados al humano.

Palabras clave: Modelos animales, Pancreatitis, úlcera péptica.

Índice

Resumen	2
Introducción	4
Úlcera péptica	4
Antecedentes	4
Concepto	4
Causas	4
Clínica	5
Diagnóstico	5
Tratamiento	5
Pancreatitis	6
Antecedentes	6
Concepto	6
Causas	7
Clínica	7
Diagnóstico	7
Tratamiento	8
Objetivos	8
Materiales y métodos	9
Resultados	11
Artículos de modelos inducidos de úlcera péptica	12
Úlcera inducida por uso de AINES	12
Úlcera inducida por administración de etanol	15
Úlcera inducida por estrés	18
Artículos de modelos inducidos de pancreatitis crónica	21
Pancreatitis crónica provocada por administración de etanol	21
Pancreatitis crónica provocada por L-Arginina	23
Artículos de modelos inducidos con pancreatitis aguda	25
Pancreatitis aguda inducida por L-Arginina	25
Discusión	34
Conclusiones	37
Opinión personal	37
Bibliografía	38

Introducción

Úlcera péptica

Antecedentes

Una de las etiologías más comunes en la aparición de la úlcera péptica es el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), estos medicamentos representan más del 7,7% de todas las recetas en Europa, esta alta frecuencia de prescripción es debida al aumento del envejecimiento de la población ya que más del 90% de las recetas de AINES pertenecen a pacientes mayores de 65 años. Para evitar los efectos perjudiciales que tienen los AINES sobre la mucosa gástrica, estos se suelen prescribir juntos con un inhibidor de la bomba de protones (IBP) para controlar la secreción gástrica. Sin embargo el tratamiento de estos IBP presenta muchos efectos adversos como dolor de cabeza, diarrea, dolor abdominal, falta de sueño, fracturas relacionadas con la osteoporosis, daño renal. Esta multitud de efectos secundarios impulsa a la investigación a buscar nuevas alternativas más eficaces y seguras basando sus estudios en modelos animales extrapolables a los humanos.

Concepto

La úlcera péptica es una patología multifactorial que afecta tanto a factores endógenos y exógenos, incluido un desequilibrio entre factores ofensivos (pepsina y ácido clorhídrico) y factores de defensa (moco y bicarbonato), se presentan como una llaga en la mucosa que recubre el estómago o el duodeno.

Causas

Las principales causas son el estrés, la infección por *Helicobacter pylori*, el tabaquismo, el consumo de alcohol, la toma de antiinflamatorios no esteroideos, consumo de alcohol, gastrinomas, otros factores también pueden provocar la aparición de una úlcera como la inhibición de la proliferación

celular, la síntesis de prostaglandinas, la motilidad gástrica y los cambios de flujo sanguíneo.



Ilustración 1 *Helicobacter pylori*

Clínica

El síntoma más común es el dolor ardiente e intenso que se da en el abdomen, otros síntomas pueden ser acidez, náuseas, hinchazón gástrica, vómitos con sangre cuando se presente un sangrado de úlcera, pérdida de peso y cambios en el apetito.

Diagnóstico

El diagnóstico se sospecha mediante la anamnesis de los síntomas referidos por el paciente y se confirma con una endoscopia digestiva oral. El diagnóstico de la causa que ha producido la úlcera péptica se hace, en el caso de la infección por *H. pylori*, mediante un análisis específico de muestras de aire espirado (prueba del aliento).

Tratamiento

En casos de infección por *Helicobacter pylori* se debe administrar al menos dos antibióticos como amoxicilina y claritromicina además de la terapia concomitante de un inhibidor de la bomba de protones como omeprazol, lansoprazol o esomeprazol. La úlcera puede requerir cirugía si no se detiene el sangrado o ésta ha ocasionado una ruptura del tejido muscular del estómago.

Pancreatitis

Antecedentes

Actualmente el tratamiento de la pancreatitis suele estar limitada a la terapia de apoyo, no hay un tratamiento específico disponible y a pesar de los avances en el manejo de las posibles complicaciones, se han reportado pocos beneficios. La incidencia de esta enfermedad oscila de entre 4,9 a 35 casos por cada 100000 habitantes, si bien la mayoría de los pacientes presentan un cuadro leve, el 15-25% de los pacientes desarrollan una evolución necrosante y severo de la enfermedad asociado a un alto porcentaje de complicaciones y una tasa de mortalidad del 15-20%.

Aunque el mecanismo de la enfermedad no está del todo claro, existe un gran factor ligado al estrés oxidativo, esto ha hecho que se abran nuevas líneas de investigación acerca de estos nuevos tratamientos y teniéndose que emplear modelos animales para probar sus beneficios.

Concepto

La pancreatitis es la inflamación del páncreas provocada por las enzimas digestivas que atacan el tejido pancreático destruyéndolo y terminando en una fibrogénesis. La pancreatitis puede dividirse en crónica y aguda, siendo de cualquier forma grave y trayendo consigo complicaciones.

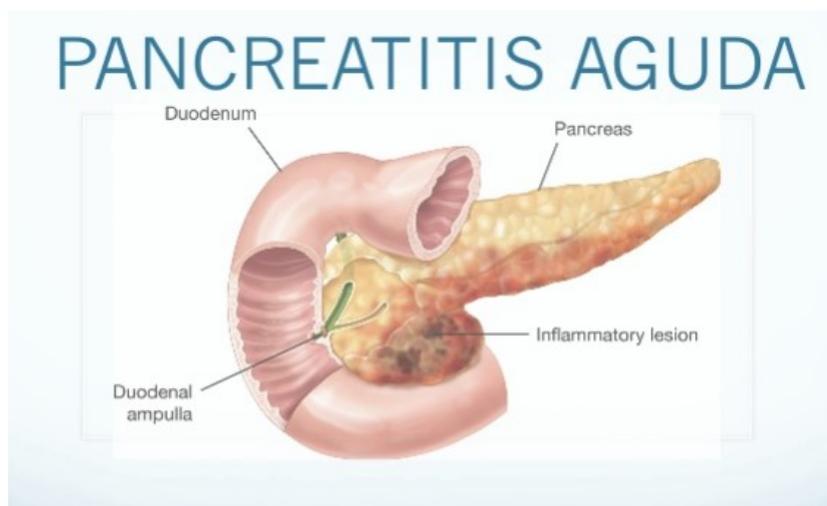


Ilustración 2 Pancreatitis

Causas

La pancreatitis tiene lugar cuando las enzimas digestivas se activan mientras están en el páncreas, lo que irrita las células del páncreas y provoca inflamación. Suele ser una enfermedad multifactorial causada en la mayoría de veces por cálculos biliares o consumo excesivo de alcohol, otras causas pueden ser medicamentos, enfermedades autoinmunes, infecciones, traumas, trastornos metabólicos, tabaquismo, una dieta pobre y alta en grasas.

En la pancreatitis crónica hasta el 70% de los casos es causado por el consumo prolongado de alcohol, otras causas incluyen cálculos biliares, trastornos hereditarios del páncreas, fibrosis quística, consumo de ciertos medicamentos, hipertrigliceridemia y en un gran parte de los casos puede ser idiopática.

Clínica

Los síntomas más de la pancreatitis aguda son dolor abdominal superior que se irradia hacia la espalda, sensibilidad e hinchazón abdominal, fiebre, aumento de la frecuencia cardiaca, náuseas y vómitos.

Los síntomas en la crónica suelen ser parecidos a los de la pancreatitis aguda. Se manifiesta un dolor constante en la zona abdominal superior que se irradia hacia la espalda y en algunos casos puede llegar a ser incapacitante, la pérdida de peso involuntaria también puede estar presente debido a una mala absorción de los alimentos. La pancreatitis crónica alcohólica no solo daña el páncreas exocrino, sino que también puede alterar y desregular el metabolismo de la insulina en el páncreas endocrino, lo que en los pacientes da como resultado el desarrollo de diabetes mellitus.

Diagnóstico

Para detectar una pancreatitis se usan exámenes de bioquímica y técnicas de imagen como:

- Análisis de sangre para medir la lipasa y la amilasa pancreática.

- Prueba de tolerancia a la glucosa
- Tomografía axial computarizada (TC)
- Ecografía endoscópica
- Resonancia magnética nuclear (RMN)

Tratamiento

Inicialmente para el tratamiento de una pancreatitis aguda es prescribir analgésicos para calmar el dolor. Posteriormente si la etiología es debida a cálculos en la vesícula se realiza una cirugía con el objetivo de extirpar la vesícula y al cabo de unos días la inflamación irá desapareciendo.

El tratamiento para una pancreatitis crónica puede ser más difícil, lo primero sería aliviar el dolor y los problemas de nutrición del paciente. Más tarde si es necesario, se debe realizar cirugía pancreática para drenar el líquido del páncreas o extirpar el tejido dañado.

Otros tratamientos adicionales para la prevención de una persona que ha sufrido una pancreatitis serían tratar el alcoholismo si esta fuera el caso de la etiología de la enfermedad y hacer un cambio en la alimentación a comidas con bajo índice de grasa.

Objetivos

El objetivo de este trabajo ha sido el de realizar una revisión bibliográfica de la literatura científica existente hasta día de hoy sobre las patologías descritas y su aplicación a los modelos de investigación animal, con el fin de ayudar a crear nuevos tratamientos y estrategias para combatir dichas enfermedades.

Para ello en este trabajo se van a:

- 1) Describir los modelos de inducción de úlcera péptica
- 2) Describir los modelos de inducción de pancreatitis crónica y aguda
- 3) Selección racional de los modelos más fiables para cada una de ambas patologías

Materiales y métodos

Este trabajo trata de una revisión bibliográfica obtenida de la base de datos Mesh durante el periodo de febrero hasta julio del presente año. La búsqueda fue realizada en ingles ya que es la principal lengua en el campo científico

La estrategia de búsqueda está basada en los siguientes descriptores para:

Úlcera péptica: Peptic ulcer; Models, animal

El operador booleano usado fue AND empleado como conector entre las palabras. Se emplearon los filtros: Free full text; published in the last 10 years; Other Animals para dar más sensibilidad quedando la siguiente ecuación de búsqueda.

("Peptic Ulcer"[Mesh]) AND "Models, Animal"[Mesh] Filters: Full text; published in the last 10 years; Other Animals se obtuvieron 461 resultados de los cuales 31 fueron seleccionados por su título, una vez se leyeron los resúmenes, los materiales y métodos y los resultados se acabaron seleccionando 12 que podían encajar bien con el tema de estudio

Pancreatitis: Pancreatitis, Chronic; Pancreatitis; Models, Animal

Los operadores booleanos empleados fueron AND y OR usados como conectores para relacionar las palabras claves con el fin de encontrar todos los artículos existentes. El conector OR se empleó para relacionar conceptos similares como pancreatitis crónica o pancreatitis refiriéndose a la aguda. Se emplearon los mismos filtros citados anteriormente: Free full text; published in the last 10 years; Other Animals y se obtuvo la siguiente ecuación de búsqueda ("Pancreatitis, Chronic"[Mesh]) OR "Pancreatitis"[Mesh] AND "Models, Animal"[Mesh] Filters: Free full text; published in the last 10 years; Other Animals con la que se obtuvieron 337 resultados de los cuales 36 se seleccionaron por su título al final 15 fueron escogidos al leer el resumen, los resultados y los materiales y métodos.

La presente revisión bibliográfica incluye los artículos que:

- Empleaban modelos animales.

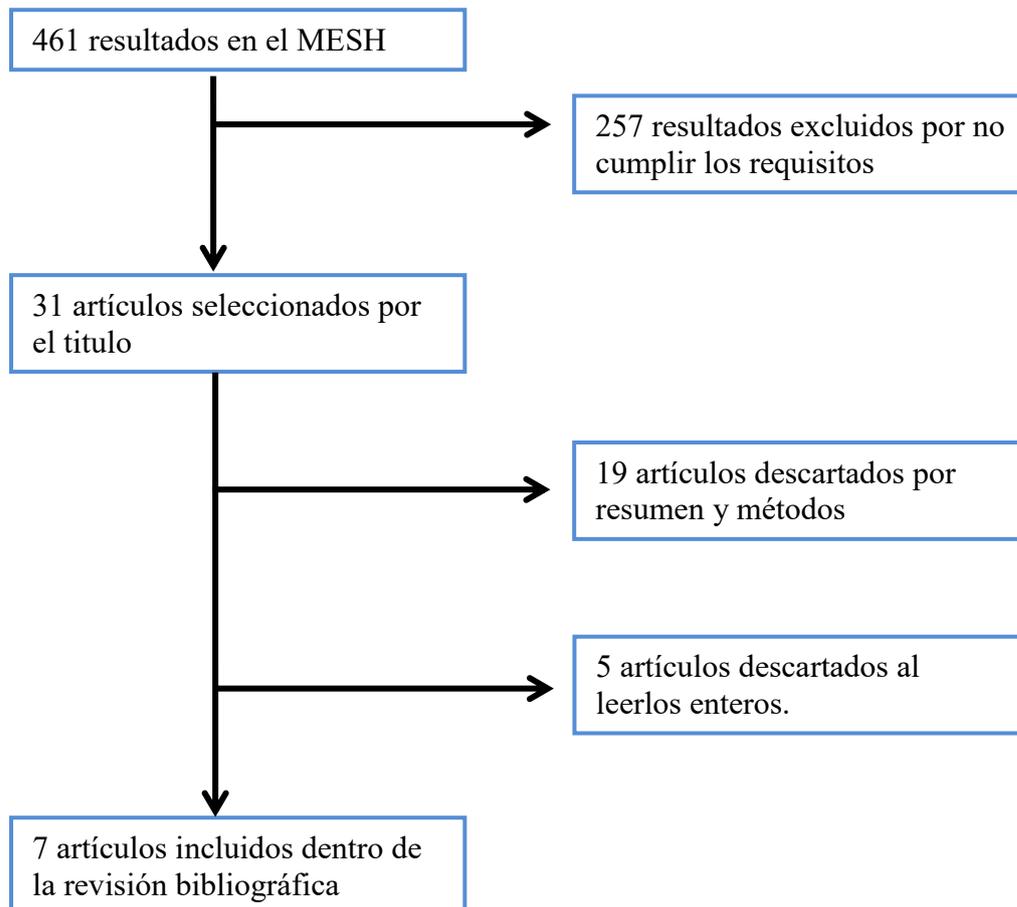
- Eran ensayos in vivo o in vitro
- Su publicación fue posterior del año 2007

Y fueron excluidos todos aquellos artículos que:

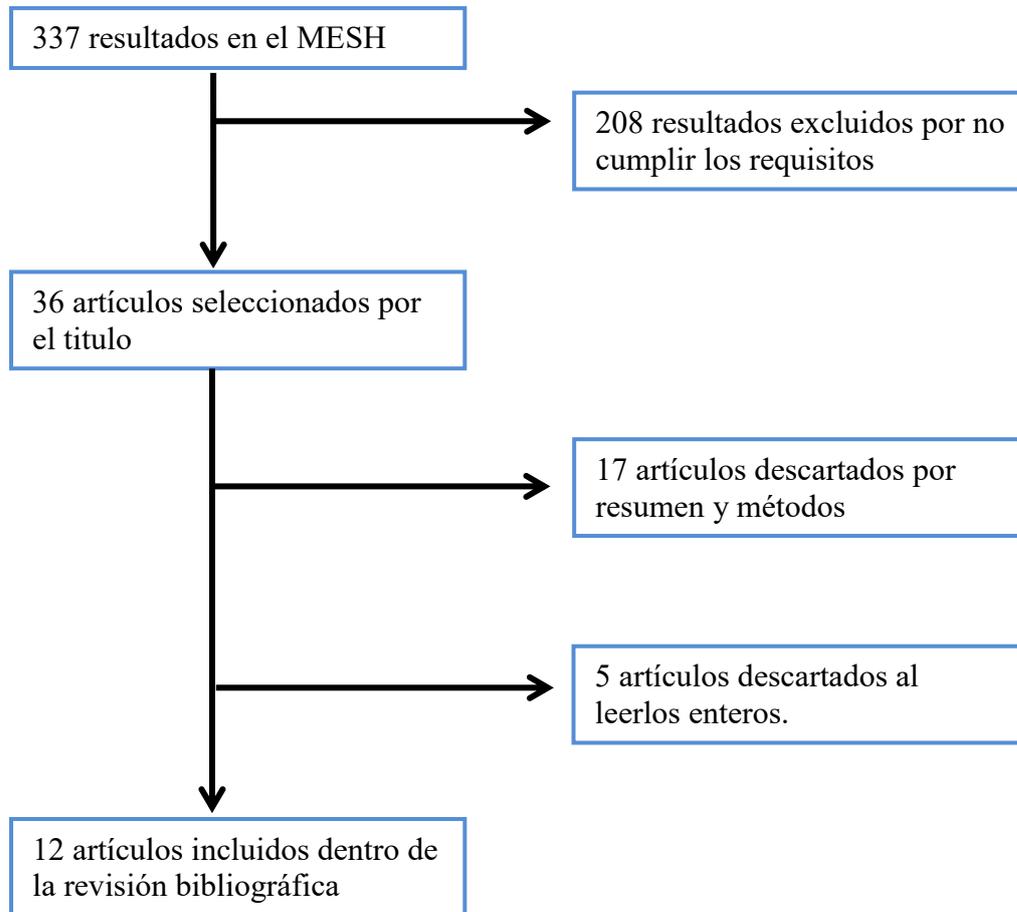
- Eran estudios en humanos
- Estuviesen redactados en lengua no inglesa
- No fuesen de acceso libre
- La fecha de publicación fuera anterior de 200

Diagramas de flujo empleados en la selección de artículos en las búsquedas.

Úlcera péptica:



Pancreatitis:



Resultados

Los modelos de experimentación animal son aquellos que se realizan únicamente en animales con el pretexto de poder extrapolar los resultados al humano. Su uso está sobre todo más extendido en estudios de toxicidad de nuevas moléculas con actividad farmacológica, análisis farmacocinéticos y estudios de carácter bioquímico y fisiopatológico en el desarrollo de distintas patologías.

Artículos de modelos inducidos de úlcera péptica

Úlcera inducida por uso de AINES

En el artículo de Ap Amang et al (2017) donde se estudiaron los efectos curativos y antiseoretos de *Eremomastax speciosa* sobre un modelo de úlcera gástrica no cicatrizada asociada a la hipersecreción de ácido gástrico, se emplearon ratas Wistar macho albinas de entre 150-200g de peso a las cuales se les indujo una úlcera gástrica mediante laparotomía inyectando 50 µL de ácido acético glacial al 30% en el estómago, tras la creación de la úlcera en el grupo control, los animales fueron sacrificados cuatro días con el fin de observar el grado de ulceración.

A los cinco días de la inyección de ácido acético se les administro indometacina suspendida en suero fisiológico (1mg/kg) una vez al día a todas las ratas restantes durante dos semanas con el fin de cronificar la úlcera al no cicatrizarse.

Para evaluar los efectos de *Eremomastax speciosa* sobre la úlcera, se dividió en dos grupos a los animales, a uno se le dio el extracto y al otro sucralfato, al grupo control se le administró el vehiculo.

Tras 6 horas después de la última administración del día 14, todos los animales se sacrificaron, los contenidos gástricos producidos por cada animal se recogieron y centrifugaron. Se midio la acidez y la producción de moco, Se comparó la curación de los grupos tratados por extracto, sucralfato y vehiculo.

Se obtuvieron unos resultados favorables que indicaban que el extracto, administrado concomitantemente con indometacina durante dos semanas, mejoró el proceso de curación de la úlcera no cicatrizada.

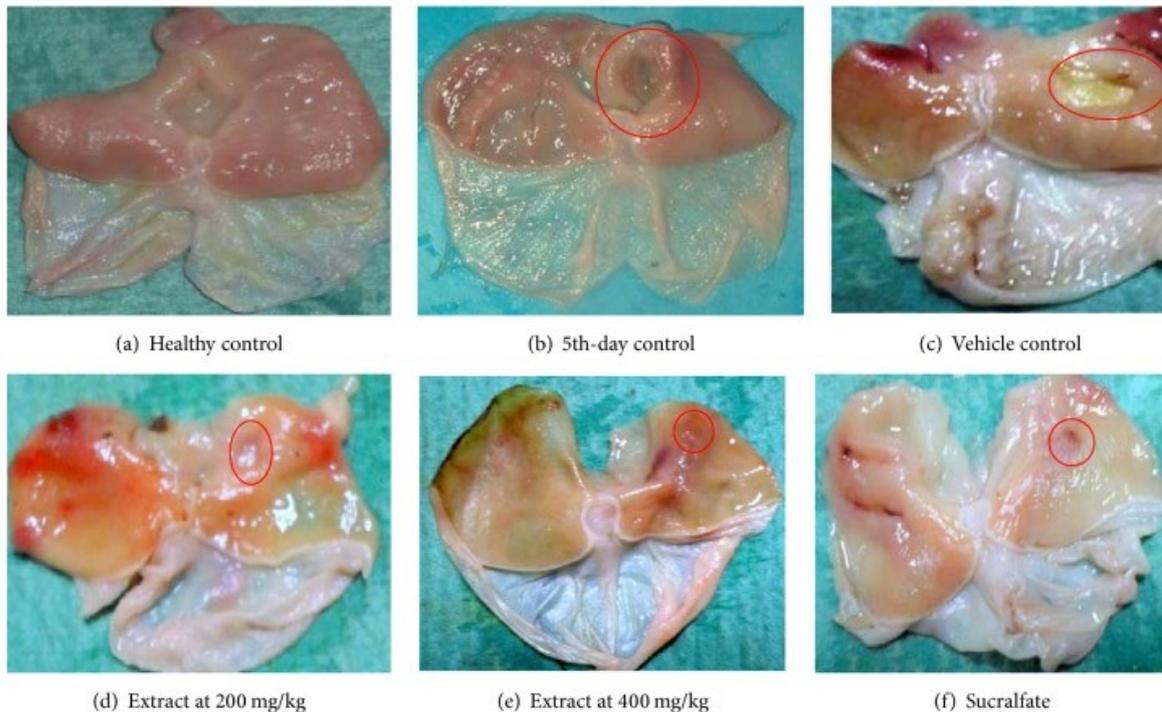


Ilustración 3

(a) Control con mucosa normal (b) Grupo control con úlcera, sacrificada al quinto día (c) Ratas con úlcera que recibieron tratamiento concomitante de vehículo e indometacina. (d-f) Ratas ulceradas a las que se les administró concomitantemente el extracto o sucralfato con indometacina durante 2 semanas

Jeong-Hwan Kim et al (2016) estudió el efecto protector del extracto hidroalcohólico del *Phellinus linteus* que tenía sobre úlceras gástricas inducidas por naproxeno en ratas Sprage-Dawley de 200-250 g. Para la realización del experimento se siguió la metodología citada a continuación.

Se separaron las ratas en 6 grupos (n=8). Al grupo no tratado se le administró agua destilada dos veces al día durante 3 días, el grupo control recibió 80mg/kg de naproxeno dos veces al día durante 3 días, otro grupo al que se le administró el vehículo del extracto y otros 3 grupos con tres dosis diferentes de extracto (1, 5 y 10µg /kg) de extracto dos veces al día durante tres días para ser posteriormente tratados con 80mg/kg de naproxeno dos veces al día durante otros 3 días.

Una vez finalizada la última administración, todas las ratas fueron sacrificadas y los estómagos de los animales extirpados y lavados. Se hicieron pruebas de medición de parámetros bioquímicos. Y se observaron los siguientes resultados.

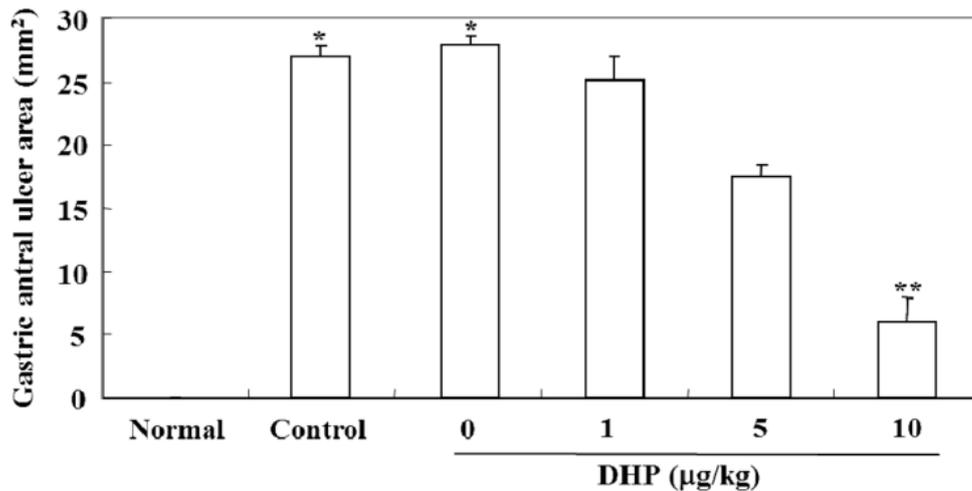


Ilustración 4 Gráfica con los resultados

Se encontraron úlceras en todos los grupos experimentales, el daño gástrico se juzgó midiendo el área de la úlcera gástrica en la superficie de la mucosa del estómago. Como se muestra en la figura, el naproxeno aumentó claramente el área de úlcera mucosa gástrica, en comparación con el grupo normal no tratado mientras que el extracto disminuyó significativamente el área de daño de una manera dependiente a la dosis en los grupos tratados con 1, 5 y 10µg /. En particular, 10 µg / kg de extracto redujeron drásticamente la profundidad y la gravedad de las úlceras antrales gástricas inducidas por naproxeno. El examen histológico reveló claramente que la úlcera antral gástrica inducida por naproxeno casi desapareció después del pretratamiento de 10 µg / kg de extracto. Los resultados revelaron que el extracto de *Phellinus linteus* protege la mucosa gástrica y evita la aparición de úlceras inducidas por AINES.

Úlcera inducida por administración de etanol

Ibrahim IA et al (2016) demostró los efectos gastroprotectores de *Monolluma quadrangula* sobre un modelo de úlcera inducida por etanol en ratas Sprague Dawley.

Para el desarrollo del modelo se usó un control positivo de Omeprazol disuelto al 10% en Tween 20 y se administró por vía oral a las ratas con una dosis de 20mg/kg de peso corporal. Con el fin de inducir la úlcera se administró etanol absoluto para el grupo control negativo (5ml/kg) y a los dos grupos experimentales se le administró el extracto a dosis de 150 y 300 mg/kg.

Tras una hora de la dosis de tratamiento previo de los grupos administrados con extracto, se le dio a todos los animales etanol absoluto 5ml/kg. Tras una hora se sacrificaron las ratas y se extirparon sus estómagos. Se realizó un Western Blot y se midieron el pH del contenido del estómago.

El efecto protector del extracto a nivel macroscópico en la mucosa gástrica resultó ser en el grupo control positivo normal al no mostrar lesión alguna sobre la mucosa gástrica. Las áreas de las úlceras de la mucosa gástrica fueron significativamente más altas en el grupo de control negativo de la úlcera, las lesiones graves de los capilares de la mucosa y la permeabilidad vascular fueron mayores en comparación con los grupos tratados previamente con omeprazol o extracto, que mostraron protección gástrica. Las ratas pretratadas con baja y alta dosis de extracto u omeprazol mostraron una reducción significativa en la formación de lesión de la mucosa gástrica y aplanamiento de los pliegues de la mucosa gástrica en comparación con el grupo control negativo.

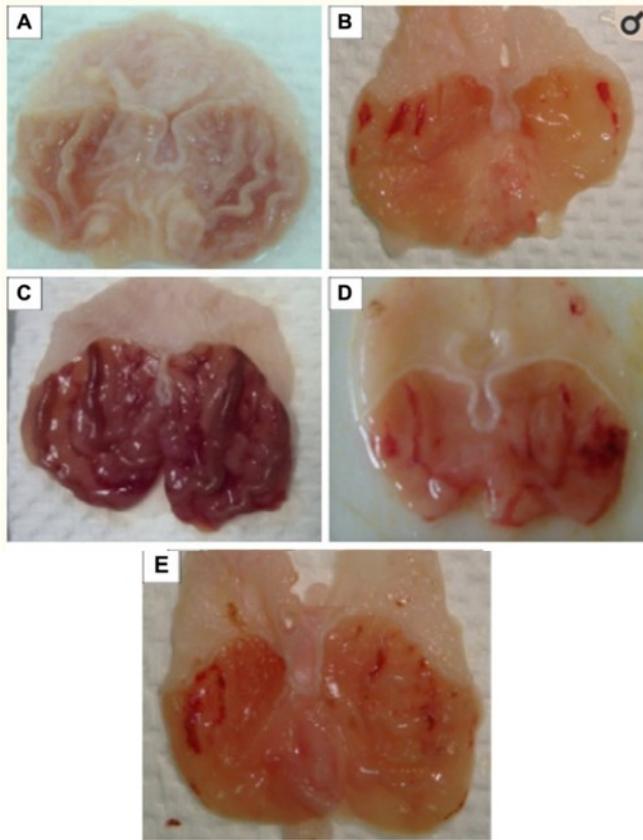


Ilustración 5 Efectos el extracto en la mucosa gástrica

(A) El grupo de control positivo no mostró lesión sobre la mucosa gástrica. (B) El grupo de control negativo mostró bandas hemorrágicas graves en la mucosa gástrica. (C) El grupo de omeprazol reveló lesiones hemorrágicas leves y aplanamiento de la mucosa gástrica. (D) Las ratas pretratadas con 150 mg / kg de extracto mostraron lesiones de la mucosa gástrica leves a moderadas y aplanamiento. (E) Las ratas pretratadas con 300 mg / kg de MHAE mostraron lesiones leves en la mucosa y aplanamiento. El presente estudio demostró el papel anticulceroso del extracto de *Monolluma quadrangula* contra lesiones gástricas inducidas por etanol.

Paulrayer A et al (2017) exploró el efecto gastroprotector de *Aronia melanocarpa* en úlceras provocadas por etanol usando un modelo animal de úlcera gástrica.

Para el experimento se emplearon ratas macho Sprague-Dawley (200-220 g). Los animales de ensayo se mantuvieron en ayunas durante 24 horas y fueron asignados en seis grupos (n=6). Los grupos control tanto negativo como positivo fueron administrados con un vehículo de carboximetilcelulosa al 0,5% mientras que los grupos restantes recibieron el extracto de *Aronia melanocarpa* a las concentraciones de 50, 100 y 200 mg/kg y el último grupo recibió 30 mg/kg de omeprazol, todos los medicamentos mencionados anteriormente se administraron con 0,5% de carboximetilcelulosa como vehículo.

Tras 30 minutos de la primera administración, todos los grupos recibieron etanol absoluto (5 ml/kg) a excepción del grupo control positivo. Después de 1 h, todas las ratas se sacrificaron y se les extrajo el estómago, se midieron las lesiones macroscópicas y se realizaron pruebas bioquímicas. Para calcular el porcentaje de inhibición de úlceras (UI) se usó la siguiente fórmula:

$$[(UI \text{ no tratado} - UI \text{ tratada}) / UI \text{ no tratado}] \times 100$$

Los resultados macroscópicos mostraron que el grupo pretratado con extracto hidroalcohólico de *Aronia melanocarpa* o el grupo con omeprazol redujeron la herida gástrica de forma exhaustiva en comparación con el grupo de control de negativo inducida por etanol. El grupo de control positivo muestra un estómago intacto y sin lesiones. El extracto a las concentraciones de 50, 100 y 200 mg/kg inhibió significativamente la IU (índice de úlceras) en un 37,59%, 65,07% y 86,37%, respectivamente, en comparación con el grupo control de úlceras inducidas por etanol. Del mismo modo, el omeprazol (30 mg / kg) también produjo un efecto gastroprotector significativo en un 91,65%. En la evaluación con el grupo de control de la úlcera, la dosis de 200 mg / kg de AMHAE mostró una actividad protectora de la úlcera sustancial en comparación con 50 y 100 mg / kg.

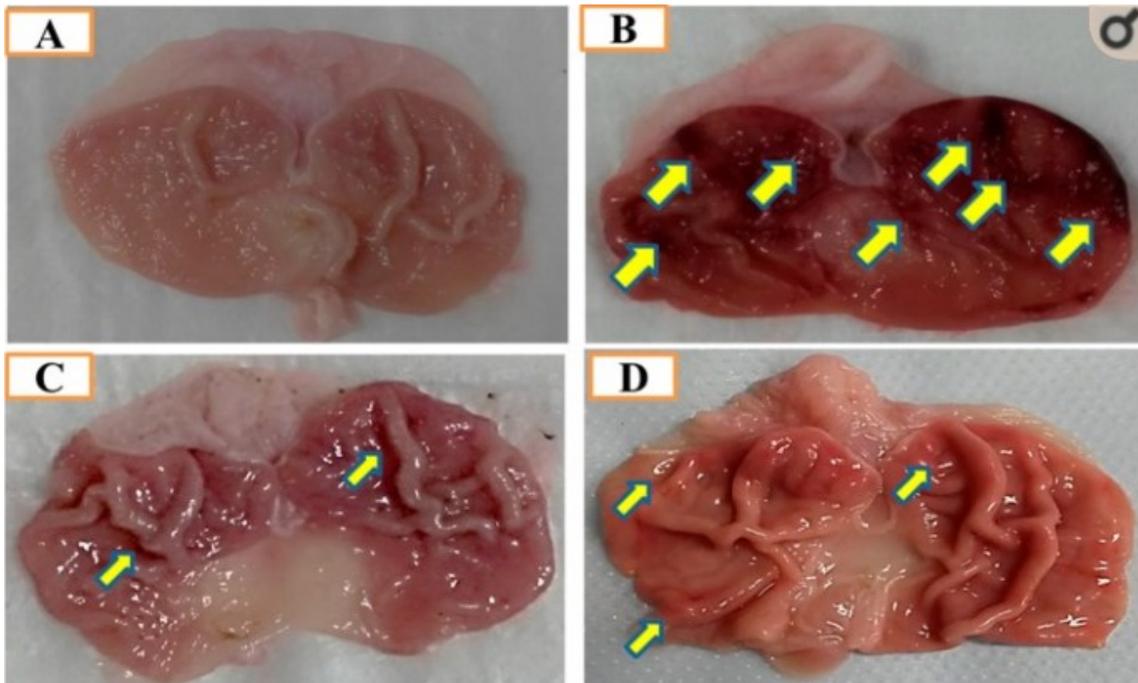


Ilustración 6 Análisis macroscópico de las lesiones

(A) ratas control positivo, no se observan lesiones; (B) control negativo, aparece daño en la mucosa; (C) Grupo pretratado con omeprazol (30 mg / kg); (D) Grupo pretratado con el extracto a dosis (200 mg / kg). Las lesiones graves inducidas por el etanol en la mucosa gástrica aparecen como bandas alargadas de hemorragia (flechas amarillas).

Úlcera inducida por estrés

Zhou ZR et al (2017) empleó un modelo de inmersión en agua y estrés de restricción (WRS) con el fin de realizar un análisis proteómico de úlceras gástricas inducidas por estrés.

En el experimento se usaron un total de 20 ratas macho Sprague-Dawley 200-220g y se introdujeron dentro de una jaula de contención que se sumergió en un baño de agua a (20 ± 2 °C) hasta el nivel del esternón. Después de 3 y 7 horas en el WRS algunos animales fueron sacrificados. Las demás ratas se sacrificaron a los 4, 8 y 15 días al haber estado 7 horas en el WRS. Una vez sacrificados a los animales se les extrajo el estómago y se midieron las

lesiones gástricas, se calculó el índice de úlcera y se procedió a la extracción de las proteínas.

Tras los análisis visuales y de software comparativos de perfiles de proteoma representativos del tejido gástrico de ratas sometidas a WRS. Los resultados se muestran en la siguiente imagen.

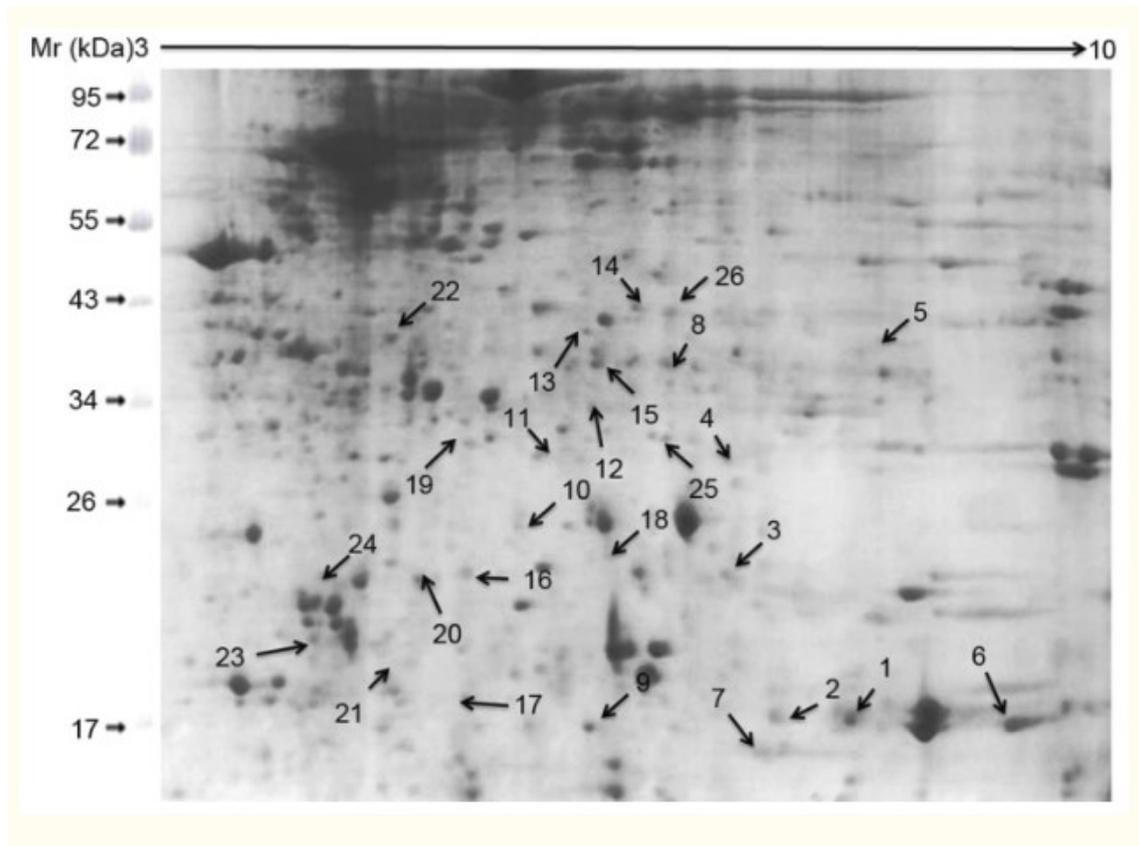


Ilustración 7 Patrón de electroforesis

El análisis cuantitativo de imágenes mostró que 26 puntos de proteína se expresaban diferencialmente, en comparación con el grupo de control. Las proteínas identificadas se asociaron con múltiples funciones como la unión a proteínas, el metabolismo energético y la muerte celular. La expresión de ciertas proteínas pueden ser importantes en el desarrollo úlceras gástricas agudas.

Saxena B et al (2017) comparó tres modelos de estrés agudo para simular la fisiopatología de la enfermedad de la mucosa relacionada con el estrés. Para ello realizó el experimento sobre ratas Wistar de 180-220g y se les indujo una

ulcera mediante un modelo de restricción por frío, un modelo de estrés por restricción y otro modelo de estrés de la inmersión en agua.

En el modelo de restricción por frío (CRS) (n=6) las ratas ayunaron durante toda la noche y se ataron sus extremidades a un bloque de madera con cinta adhesiva, manteniéndose a una temperatura de 4-7°C durante 2 horas.

En el modelo de estrés por restricción (RS), las ratas n=6 se inmovilizaron durante 4 horas en jaulas de restricción después de una noche de ayuno.

En un modelo de estrés por restricción en inmersión en agua (WRS), las ratas ayunaron durante la noche y se inmovilizaron de manera similar al modelo de estrés pro restricción, luego se sumergieron verticalmente hasta el esternón en el baño de agua a (20-25°C). El cuerpo se secó después de cuatro horas de estrés y las ratas fueron devueltas a sus jaulas.

Después de los experimentos las ratas fueron sacrificadas y se les extrajeron sus estómagos. Se estimó el índice de ulcera por una persona que desconocía el protocolo experimental.

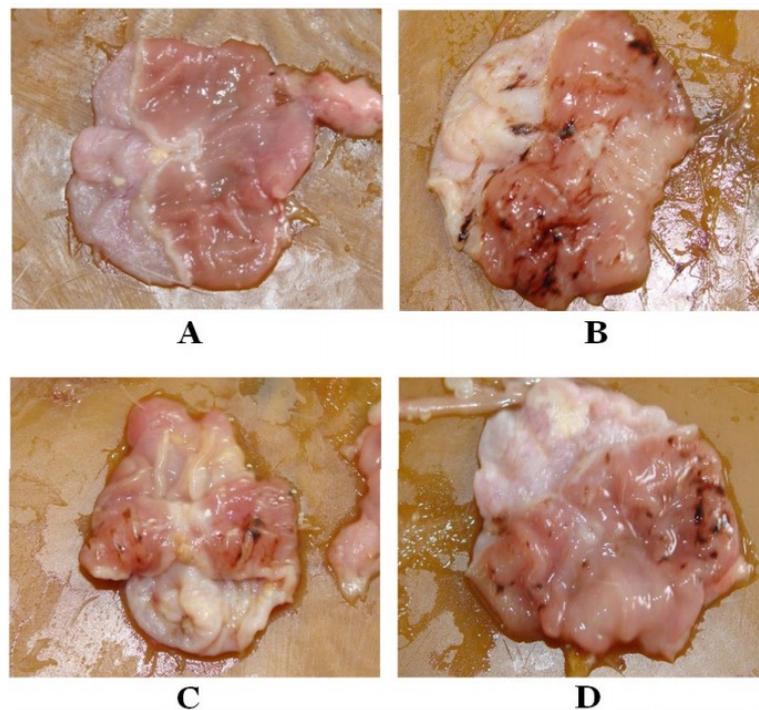


Ilustración 8 Examen histopatológico de las lesiones

El análisis macroscópico mostró que en (A) no había ningún tipo de ulceración al tratarse del grupo control y en todos los demás experimentos se aprecia la

aparición de úlceras en la mucosa, siendo (B) CRS, (C) RS y (D) WRS. Siendo el modelo más afectado el CRS.

Artículos de modelos inducidos de pancreatitis crónica

Pancreatitis crónica provocada por administración de etanol

McIlwrath SL et al (2015) caracterizó un modelo de pancreatitis crónica inducida por una dieta alta en grasas y elevado consumo de alcohol imitando dietas humanas. Para ello empleó un total de 16 ratas Fischer macho que pesaban 230-250g.

La metodología del experimento fue la siguiente: Los animales se dividieron en dos grupos (1) controles ($n=7$) que recibieron comida para roedores y (2) grupo experimental ($n=9$) que fueron alimentadas con un alcohol Lieber-DeCarli modificado (6%) y una dieta alta en grasas (65%) durante 10 semanas.

En la última semana a los animales se les realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en ayunas, con el objetivo de medir los niveles de glucosa en sangre antes y después de una inyección de glucosa de 2 g / kg por vía intraperitoneal. Después de la décima semana los animales se sacrificaron y los análisis histopatológicos revelaron que las ratas que siguieron la dieta alta en grasas desarrollaron una elevada presencia de espacios intralobulares, fibrosis y depósitos de colágeno en el páncreas.

Zhang L et al (2014) un año antes empleó el mismo modelo de pancreatitis crónica para demostrar como el agonista del receptor 2 de cannabinoides (LY3038404 HCl) atenúa el comportamiento relacionado con el dolor en ratas. . Para el experimento se emplearon ratas Fischer macho de 240-250g. Las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: alimentados con alcohol y dieta líquida alta en grasas ($n = 12$) y grupo control alimentado con comida de roedor ($n = 6$). Los animales se enjaularon solos y se mantuvieron en un ciclo de 12/12 horas de luz oscura invertida. Las dosis de alcohol se fueron aumentando semana a semana. Cada rata consumió entre 50-70 gramos de dieta líquida con alcohol por día durante 12 semanas. Los animales también recibieron un

suplemento diario de manteca de cerdo (8 g / día / por rata) que eleva el contenido total de grasa de su dieta a aproximadamente un 20% del consumo total diario de grasa en la dieta. Las ratas con una dieta alta en grasas y alcohol manifestaron comportamientos viscerales similares al dolor que fueron documentados en pruebas comportamentales y un análisis histopatológico documentó degeneración global de la glándula pancreática, vacuolización y fibrosis.

A los animales se les realizaron pruebas conductuales para poder determinar el grado de dolor que tenían.

Evaluación de la alodinia mecánica: Para esta prueba las ratas fueron puestas sobre una malla y se les aplicaron perpendicularmente una serie de filamentos de von Frey sobre la superficie plantar durante 5 segundos, las respuestas positivas fueron definidas como la estimulación del pie al contacto con el filamento. Siempre que hubo una respuesta negativa o positiva, se aplicó el siguiente filamento más fuerte o más débil, respectivamente.



Ilustración 9 Microfilamentos de Von Frey

Evaluación de la hiperalgesia secundaria al calor abdominal: Se proyectó una fuente de calor en forma de rayo de luz de alta intensidad sobre la piel abdominal afeitada de las ratas a través de un cristal. El tiempo de cese de la radiación fueron 40 segundos para evitar cualquier daño en la piel. Las respuestas positivas fueron establecidas como valores de latencia de retirada del abdomen acortados.

Prueba de claro / oscuro: Se empleó una caja clara oscura con dos compartimentos para evaluar comportamientos similares al que se da en ansiedad en ratas. Los animales se dejaron inicialmente en la zona oscura y los comportamientos se registraron durante 10 minutos. Los parámetros que se documentaron fueron el número de cruces que el animal pasaba de la caja oscura a la clara y el tiempo total que el animal pasaba en la cámara de luz.



Ilustración 10 Caja clara –oscura

Pancreatitis crónica provocada por L-Arginina

Tanto Chen L et al (2017) como Duan LF et al (2017) basaron sus estudios en modelos crónicos de pancreatitis crónica inducido por L-Arginina en ratones. Los dos investigadores siguieron la misma metodología dividiendo en tres grupos (n=36) a los animales: el grupo control, un grupo al que se le indujo la pancreatitis crónica (CP) y otro grupo al que se le indujo la pancreatitis crónica pero que fue tratado. Para inducir la pancreatitis crónica en los grupos

anteriores se inyectó por vía intraperitoneal L-arginina al 20% dos inyecciones (3g/kg) separadas una hora, semanalmente durante 6 semanas, mientras que a los ratones del grupo control se le inyectó solución salina. Los ratones del grupo experimental fueron tratados todos los días una semana después de las inyecciones de L-Arginina al 20%.

Los ratones fueron anestesiados y sacrificados a las 2 semanas, 4 semanas y 6 semanas después la inyección de 20% de L-arginina o de solución salina (n = 9 en cada semana). Se recogieron muestras de sangre, se extrajo el páncreas, una parte del páncreas se fijó en solución de formaldehído al 4% para hematoxilina y eosina (HE) y tinción de inmunofluorescencia, mientras que la otra parte se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 ° C para la extracción de ARN y proteínas.

A las dos semanas de la inyección de L-arginina ya se observan signos morfológicos de pancreatitis crónica, que incluyen infiltración de leucocitos, necrosis de células acinares y una pequeña cantidad de deposición de tejido conectivo. A las 4 semanas y 6 semanas, se observó la pérdida de células acinares, la deposición de colágeno y la fibrosis agravado en el páncreas.

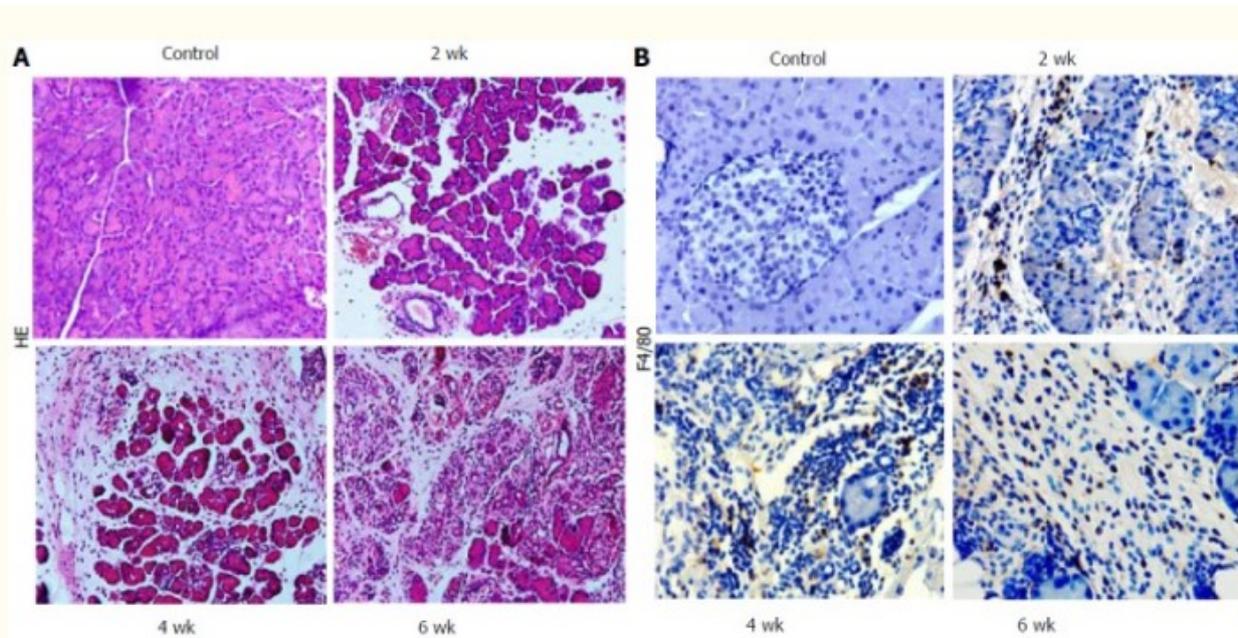


Ilustración 11 Estudio histopatológico de las muestras pancreáticas

Artículos de modelos inducidos con pancreatitis aguda

Pancreatitis aguda inducida por L-Arginina

Uçmak Fet al (2016) investigó el efecto potencial de la silibina, un potente antioxidante, en la pancreatitis aguda inducida por L-arginina en un modelo de rata experimental. Para ello empleó 40 ratas Wistar hembra de 200-250g que se dividieron en 5 grupos de la siguiente manera: Grupo 1 (C): grupo control (n = 8), grupo 2 (SL): grupo silibina (n = 8), grupo 3 (LA): grupo de pancreatitis aguda (n = 8), grupo 4 (SLLA): grupo de profilaxis (n = 8) y grupo 5 (LASL): grupo de tratamiento (n = 8).

La pancreatitis aguda fue inducida por dos inyecciones de 250 mg / 100 g de L-arginina administrada por vía intraperitoneal a intervalos de 1 h en el grupo LA, el grupo SLLA recibió una inyección ip única de silibina en una dosis de 100 mg / kg de peso corporal 60 minutos antes de la inducción de pancreatitis aguda con L-arginina, mientras que el grupo LASL recibió la misma dosis de silibina después de la segunda inyección de L-arginina. El grupo SL recibió una única inyección ip de silibina a una dosis de 100 mg / kg de peso corporal. Por último, el grupo C sirvió como grupo de control y recibió 2 inyecciones ip de solución salina fisiológica con una hora de diferencia.

Los análisis histopatológicos revelaron que las puntuaciones de edema, inflamación perivascular y necrosis, así como los puntajes totales, fueron más altos en el grupo de LA. Mientras que en los grupos tratados con silibina mejoró el aumento del estrés oxidativo en un modelo de AP experimental en este estudio. La administración profiláctica de silibina, por otro lado, mejoró los parámetros de estrés histopatológico y oxidativo.

Siguiendo una metodología similar a la anterior Robles L et al (2015) estudió sobre como el dimetilfumarato (DMF), un potente antioxidante y antiinflamatorio, puede mejorar la pancreatitis aguda (AP) en un modelo de roedor. Para el experimento se emplearon ratas macho Sprague Dawley y estas se dividieron en tres grupos, un grupo control (n=3), un grupo con AP (n=12) y otro grupo al que se le administro el DMF y se le indujo AP (n=12). Los

animales experimentales recibieron DMF oral (25 mg / kg) disuelto en metil celulosa y se alimentaron mediante sonda oral 24 horas antes de inducir la AP. La solución se administró a ratas no ayunadas en dos inyecciones intraperitoneales a una dosis de 3 g / kg de peso corporal, cada inyección se separó 1 hora. Todos los grupos recibieron buprenorfina (0.01 mg / Kg) IM dos veces al día. Los animales fueron sacrificados después de la inducción de L-arginina a las 24 horas para evaluaciones bioquímicas e histológicas.

AP se calificó utilizando un sistema de clasificación cuantitativa como se describe por Schmidt et al basado en la presencia de edema, infiltración de leucocitos, necrosis de células acinares y hemorragia.

Puntuación	0	1	2	3
Edema intersticial	ninguna	Interlobular	Lóbulo involucrado	Isla aislada como células acinares
Infiltración de leucocitos	ninguna	<20%	20-50%	> 50%
Necrosis de células acinares	ninguna	<5%	5-20%	> 20%
Hemorragia	ninguna	1-2 puntos	3-5 puntos	> 20%

Ilustración 12 Puntuación cuantitativa de la pancreatitis

El tratamiento con DMF oral en la pancreatitis experimental inducida por L-arginina dio como resultado reducciones significativas en las células inflamatorias infiltrantes, el daño arquitectónico acinar, el edema y la necrosis.

Nuevo modelo de pancreatitis aguda

Arslan S et al (2015) generó un nuevo modelo animal de pancreatitis usando *Ecballium elaterium* (EE) al observar los efectos nocivos observados en la pancreatitis aguda. Para realizar el experimento se usó un total de 32 ratas Wistar de 200-250g, las ratas se dividieron en 4 grupos de n=8.

En el grupo control se administró una inyección intraperitoneal (ip) de solución salina

En el grupo 2 se administró L-arginina (LA) 100mg/100g ip dos veces a intervalos de 1 hora dando como resultado pancreatitis aguda.

En el grupo 3 se administró dos veces LA 100mg/100g ip a intervalos de una hora dando como resultado AP. Posteriormente, se administró IP EE (2,5 mg / kg) en dos dosis iguales, 30 min y 12 h después de la inyección de LA.

Grupo 4 (EE): IP EE (2,5 mg / kg) se administró en dos dosis iguales a los 30 min y a las 12 horas.

24 horas después las ratas fueron sacrificadas se les extrajo el páncreas y los pulmones, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E), y se realizó un examen histopatológico. El análisis histopatológico reveló que el edema, la inflamación, la necrosis y la hemorragia fueron significativamente más altos en el grupo LA + EE que en el grupo control.

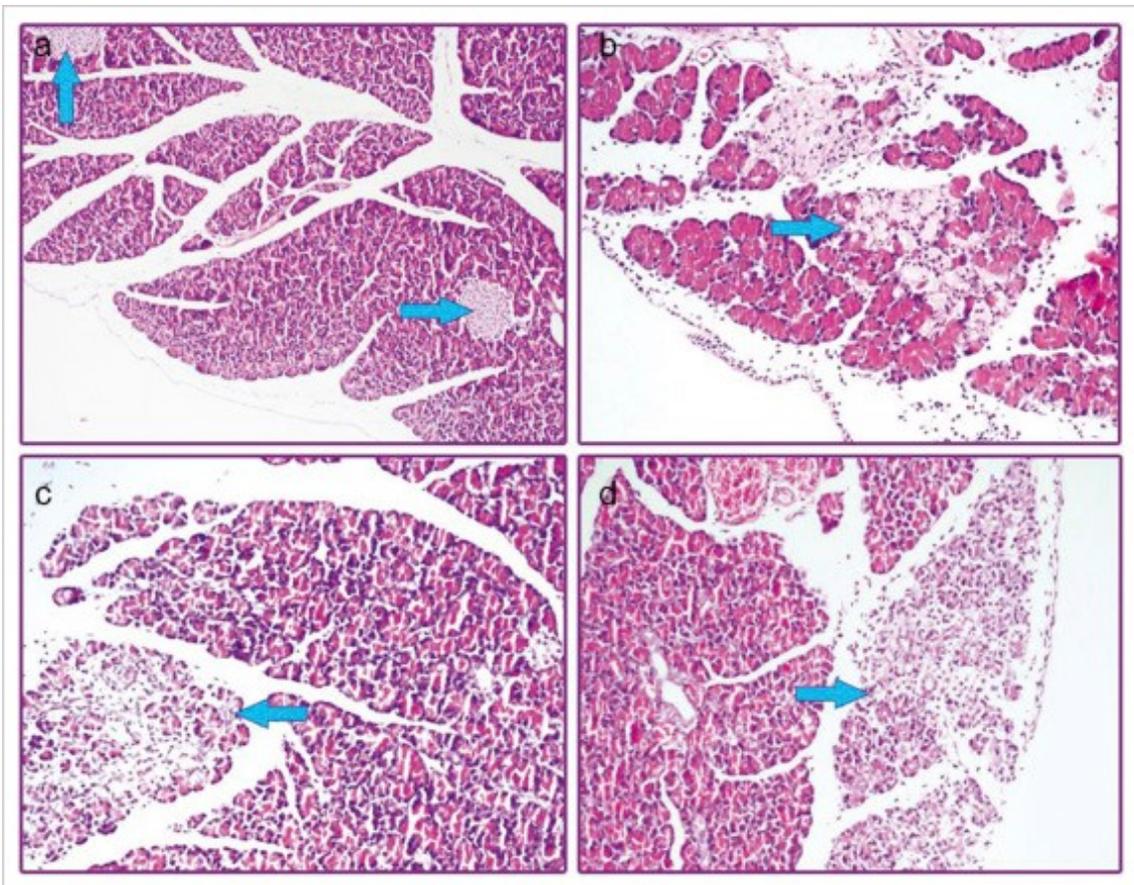


Ilustración 13 Examen histopatológico de las muestras pancreáticas

El examen histopatológico reveló necrosis de células acinares pancreáticas en el grupo de LA (b), el grupo EE (c) y en el grupo LA + EE (d). Además, la necrosis fue mayor en las ratas que recibieron LA y EE en comparación con las ratas que recibieron solo LA o EE.

Pancreatitis aguda inducida por Taurocolato sódico

de Oliveira Andrade R et al (2017) empleó un modelo murino para evaluar los efectos del diazóxido en la pancreatitis aguda.

Para ello se usaron 58 ratas Wistar de 200-400g, a los animales se les canuló la vena de la cola y se dividieron en dos grupos antes de inducir la pancreatitis aguda (AP).

El grupo control recibió solución salina (0,9%) 15 minutos antes del procedimiento quirúrgico. Al grupo experimental se le administró diazóxido (45mg/kg) antes de la inducción de AP.

La identificación y oclusión del conducto biliar a nivel del hilio hepático se realizó con una pinza bulldog. La porción no mesentérica del duodeno se puncionó con una aguja (25 mm × 7 mm). El conducto biliar se cateterizó con un catéter de polietileno (PE-10). Después del cateterismo, se inyectaron 0,5 ml de taurocolato sódico (2,5%) de forma retrógrada durante 1 minuto. Luego, se retiró el catéter, se cerró la punción duodenal, se retiró la pinza bulldog y se cerró la pared abdominal en capas. Los animales fueron puestos en observación durante 72 horas.

El páncreas se fijó en formol al 10% y se incrustó en parafina. Las secciones tisulares se tiñeron con hematoxilina y eosina para análisis histopatológicos con microscopio óptico. La escala de Schmidt se usó para clasificar el grado de AP. La expresión de citoquinas inflamatorias en plasma se evaluó mediante ELISA

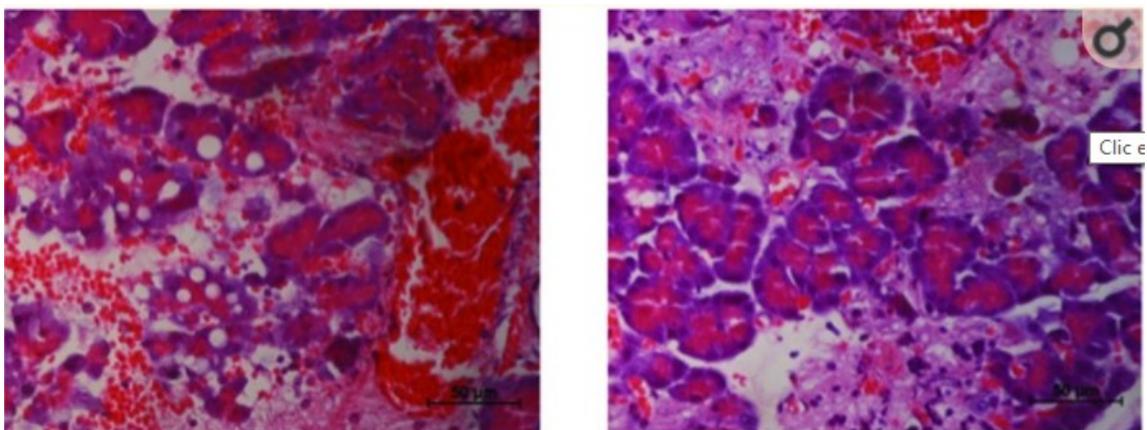


Ilustración 14 Análisis histopatológico de muestras pancreáticas

El análisis histopatológico resultante mostró que en el grupo tratado con diazóxido este disminuyó la necrosis de las células acinares en la pancreatitis aguda (AP). La inducción de AP con taurocolato sódico provocó necrosis de células acinares (imagen izquierda). En el grupo tratado con diazóxido, hubo una reducción significativa en el número de células dañadas (imagen derecha).

Dang SC et al (2015) investigo el efecto protector de los liposomas que contienen clodronato en la lesión aguda de la mucosa gástrica (AGMI) causada por una pancreatitis aguda grave (SAP) en ratas.

Para el experimento se usaron 48 ratas Sprague-Dawley 350-385g, las ratas se dividieron aleatoriamente en tres grupos: grupo C (control), grupo P Clodronato y fosfato-buffer salino + pancreatitis aguda grave (SAP + PBS-liposoma) y grupo T (SAP + clodronato-liposoma). Estos grupos se dividieron a su vez en dos subgrupos a las 2 y a las 6 horas de establecer la SAP (n=8). La SAP se indujo mediante la inyección de taurocolato de sodio (2ml/kg) en el espacio subcapsular pancreático. Se inyectaron liposomas que contenían PBS (2ml/kg) en las ratas del grupo P a través de la vena de la cola, de igual forma fueron inyectados los liposomas en las ratas del grupo T y la solución fisiológica en el grupo C

A las 2 y 6 h después de las inyecciones, los animales se sacrificaron y se recogieron la mucosa gástrica y el páncreas. Para evaluar el nivel de TNF- α , se recolectó sangre de la vena mesentérica superior. El nivel sérico de TNF- α se estimó utilizando un kit ELISA.

En el examen patológico se fijaron muestras del tejido gástrico y pancreático en formalina. El puntaje patológico pancreático se evaluó de acuerdo a los parámetros de puntuación de Kaiser.

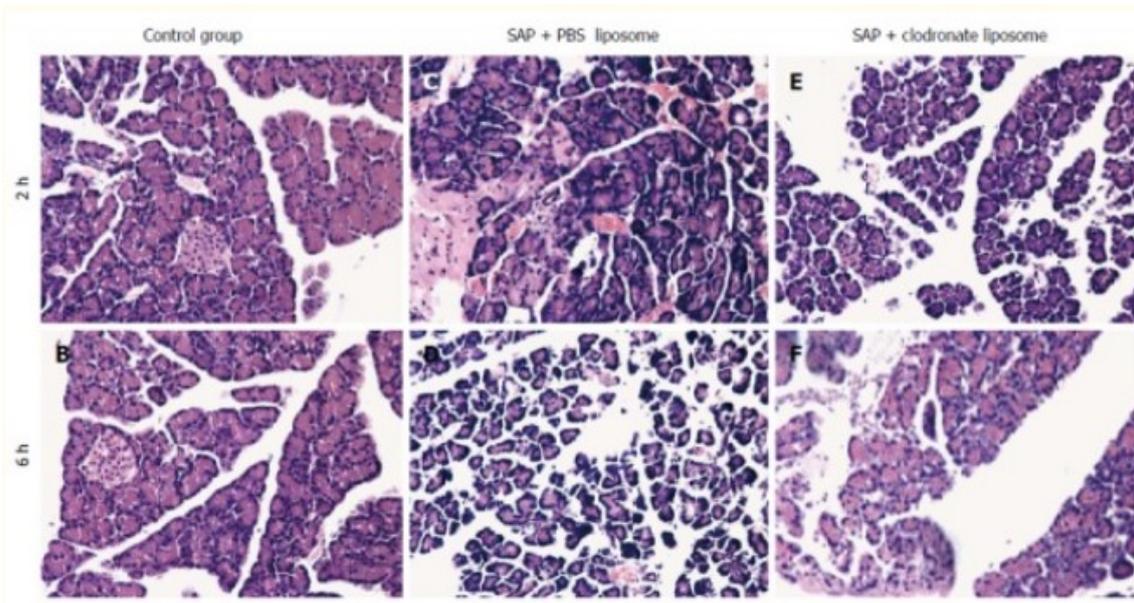


Ilustración 15 Análisis histopatológico del páncreas

El páncreas de las ratas en el grupo C no mostró ningún cambio morfológico
 El páncreas de ratas en el grupo C no mostró cambios morfológicos (imagen A y B). Se observó infiltración significativa de células inflamatorias en el grupo P (imagen C y D). Se observó edema pancreático leve, hemorragia e infiltración de células inflamatorias en el grupo T (imagen E y F)

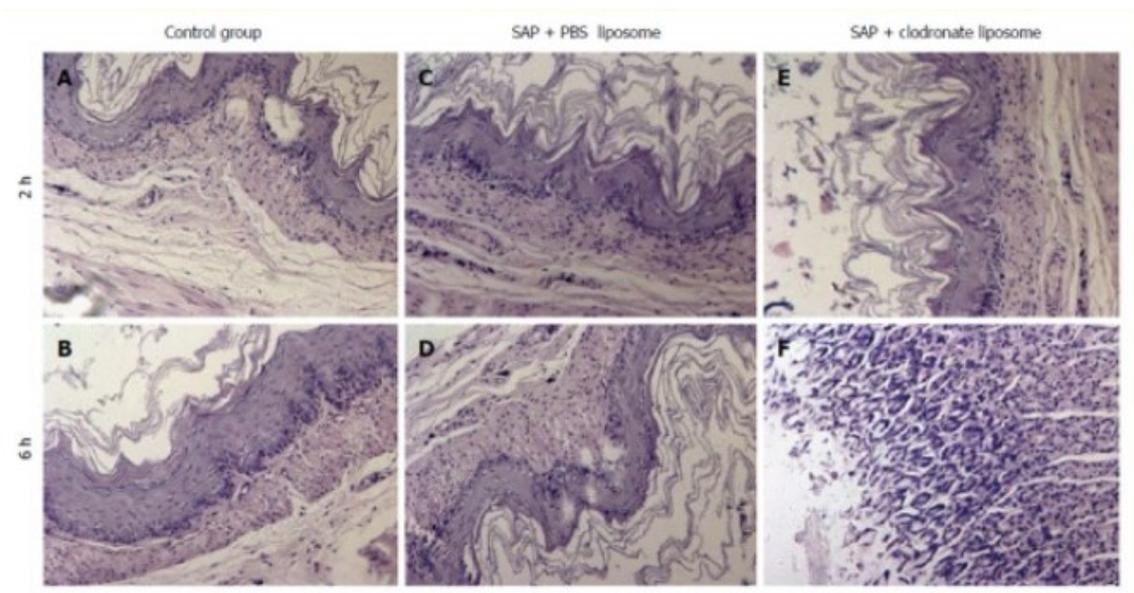


Ilustración 16 Análisis histopatológico de la mucosa gástrica

No hay cambios morfológicos en las ratas del grupo C (imagen A y B). Se observó secciones gástricas con necrosis de la mucosa en el grupo P. La mucosa gástrica quedó levemente dañada en el grupo tratado con los liposomas que contenían el fármaco.

Pancreatitis aguda inducida por ceruleína

Angij S et al (2016) evaluó los efectos del montelukast sobre el daño pancreático en un modelo experimental de pancreatitis aguda. En el estudio se usaron 40 ratas macho Sprague-Dawley con un peso de 295-325 g.

Las ratas se dividieron en 4 grupos de n=10 los cuales fueron, grupo C al que se le administró ceruleína, el grupo CMe al que se le administró ceruleína + Montelukast temprano, CMI grupo al que se le administró Cerulein + Montelukast tardío y el grupo control CO. La ceruleína se administró vía subcutánea para inducir el daño pancreático. En el grupo CMe se inyectó el montelukast por vía subcutánea dos veces (10mg/kg) a las 4h y a las 8h antes de la dosis de ceruleína (20µg /kg) 4 veces a intervalos de una hora entre las dosis. En el grupo CM1, las ratas fueron inyectadas por vía subcutánea con ceruleína en una dosis de 20 µg / kg, 4 veces, con intervalos de 1 h entre las dosis, y luego se inyectó 10 mg / kg de Montelukast sódico por vía subcutánea a las 4 y 8 h después de la primera dosis de ceruleína. En el grupo control, a las ratas se les inyectó por vía subcutánea una solución de NaCl al 0,9% en el mismo volumen que la ceruleína (0,2 ml) un total de 4 veces a intervalos de 1 h. En el grupo C se inyectaron 20 µg/kg de ceruleína por vía subcutánea 4 veces a intervalos de una hora entre las dosis.

12h después de la primera dosis de ceruleína las ratas fueron sacrificadas, se tomaron muestras de sangre y el páncreas fue extirpado

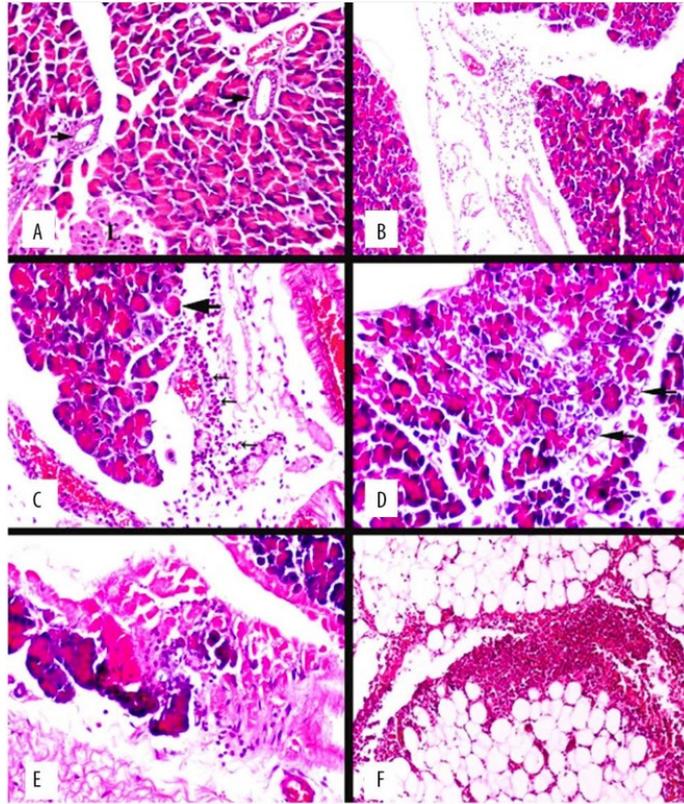


Ilustración 17 Examen histopatológico de las muestras de páncreas

(A) Tejido pancreático normal en el grupo control. (B) Inflamación y edema en el grupo Cme. (C) Inflamación y necrosis en el grupo CMe. (D) Vacuolización y necrosis en páncreas en el grupo CMe. (D) y (E) Vacuolización y necrosis en el grupo C. (F) Inflamación en el tejido graso peripancreático en el grupo CMI.

Wang Y et al (2016) comparó los modelos tradicionales de inducción de pancreatitis aguda en roedores con un método novedoso de administración de etanol y ácido palmitoleico (POA) en hámster dorado sirio. Para el experimento se emplearon hamsters de 150g que fueron divididos en grupo control y experimental (n=10), los hamsters fueron ayunados durante la noche antes de la inducción de pancreatitis aguda.

Inducción de pancreatitis con cerelúina: Se inyectó una solución esteril de cerelúina que se inyectó por vía intraperitoneal (50 µg / kg por hora) en 7 inyecciones. Al grupo control se le inyectó solución salina.

Inducción de pancreatitis mediante L-arginina: Se inyectó de forma intraperitoneal una solución estéril de hidrocloreto de L-arginina en solución salina normal a una concentración del 8% en una dosis de 1,5-6 g / kg dos veces cada hora. Al grupo control se le inyectó solución salina.

Inducción de pancreatitis con Na-taurocolato: Los hamsters fueron anestesiados y se procedió a realizar una incisión en la línea media para exponer el duodeno con la cabeza pancreática adherida, se introdujo una aguja de transfusión (30G) conectada a una bomba de microinfusión a 2 mm del conducto pancreático. Para evitar el reflujo hepático, el conducto hepático común se sujetó con una pequeña pinza bulldog. Se infundieron 300 µl de Na-taurocolato (2%, 40 mg / kg) en el conducto pancreático a una velocidad de 30 µl / min.

Los páncreas de los animales se extirparon en diferentes momentos de estos 4 modelos de pancreatitis, específicamente 24 horas en caeruleina, 72 horas en L-arginina, 24 horas en Na-taurocolato y 24 horas en etanol + Inducido por POA. Después de la inducción de pancreatitis aguda, el tejido del páncreas exhibió edema, necrosis, infiltración inflamatoria y hemorragia acinar en todos los modelos estudiados

En estos modelos se midió como biomarcador la amilasa pancreática y la actividad de la peroxidasa (MPO) para el daño de la célula acinar. La patología del páncreas se examinó con observación anatómica y tinción HE

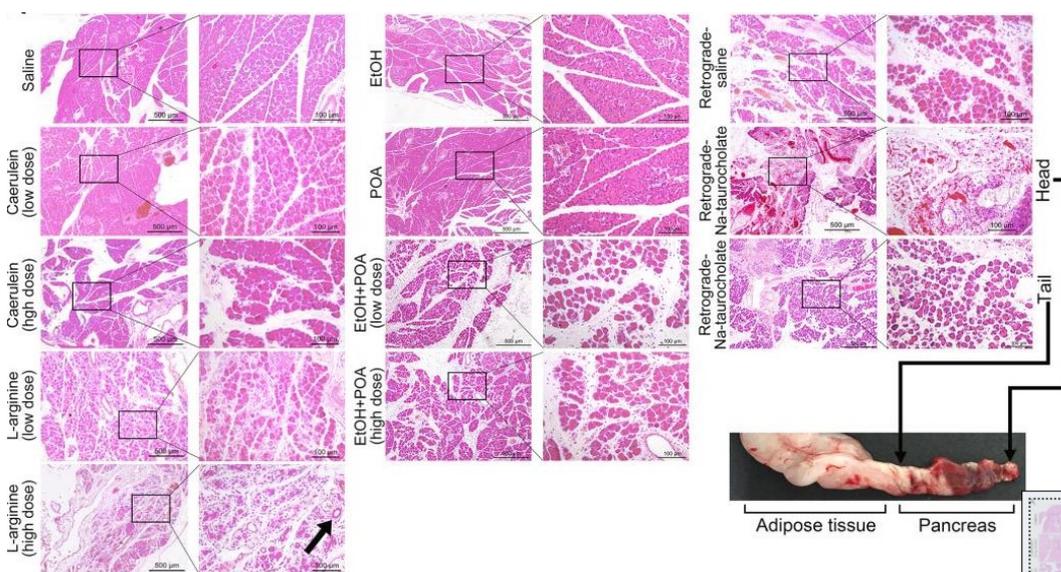


Ilustración 18 Análisis histopatológico de las muestras pancreáticas

La cereluina indujo una pancreatitis aguda menor principalmente con edema e infiltración de neutrófilos, L-arginina indujo una pancreatitis aguda grave principalmente con necrosis acinar, infiltración de células inflamatorias intensas y una alta tasa de mortalidad, junto con esta el Na-taurocolato también indujo una pancreatitis aguda grave con necrosis y la infiltración inflamatoria. La pancreatitis aguda inducida por etanol + POA mostró la severidad entre la cereluína y la inducción de L-arginina con edema evidente, un gran número de infiltración de neutrófilos y necrosis acinar.

Discusión

En esta revisión bibliográfica se han expuesto diversos artículos donde se ponían en práctica distintos modelos animales.

Análisis de los estudios de úlcera péptica

Los modelos de inducción de úlcera péptica descritos en este trabajo han sido los provocados por AINEs, etanol y estrés.

En el modelo a estudio de Kim JH donde se usó de naproxeno en ratas lo que provocó lesiones ulcerativas reproducibles en humanos con una baja tasa de mortalidad. Estas lesiones llegaron a alcanzar un tamaño de hasta 28 mm² pero no tenían la suficiente profundidad en la mucosa gástrica como para originar un cráter de úlcera. Amang AP empleó ácido acético mediante laparotomía para generar las úlceras y luego administró indometacina con la finalidad de que la úlcera no cicatrizase y se formara un cráter en la lesión, estas tenían un tamaño de hasta 62 mm², pero el tratamiento agresivo de la laparotomía producía mucho dolor y estrés al animal. Los modelos provocados por etanol siempre han sido ampliamente utilizados por los investigadores en modelos animales, ya que se provoca una herida debido al daño vascular y necrosis de las células del estómago, el etanol estimula las secreciones del estómago al provocar la liberación de gastrina e histamina, estos efectos son replicables en personas que padecen alcoholismo crónico pero también se

puede dar en consumos altos y agudos. En el modelo descrito por Ibrahim IA, las lesiones generadas por consumo de etanol son de unos 500 mm² siendo más eficaces que los que son descritas en AINEs ya que con estos dos últimos modelos se busca inducir úlceras y tratarlas con algún extracto vegetal que ayude a cicatrizarlas o que sirva de protector gástrico para que no se produzcan de forma tan agresiva.

Por otra parte los modelos de estrés tiene otra finalidad como la de mostrar un análisis de las proteínas que se expresan sobre la mucosa gástrica en condiciones de estrés como el que es descrito por Zhou ZR o el de comparar distintos modelos de estrés para establecer cuál de ellos sirve mejor para describir la enfermedad de la mucosa relacionada con el estrés que presenta Saxena B.

Análisis de los estudios de pancreatitis

Los modelos de pancreatitis crónica inducidos por dieta alta en grasas y consumo elevado de alcohol pretenden replicar una dieta alta en grasas que se suele dar en pacientes alcohólicos. Los dos artículos descritos de McIlwrath SL y de Zhang L presentan estos modelos y tienen como finalidad atenuar el dolor de los animales sometiéndoles a pruebas comportamentales. Este tipo de modelos someten a los animales a un alto grado de sufrimiento y de estrés ya sea por el tiempo que deben aguantar con la enfermedad (10 semanas) al querer reproducir una enfermedad crónica y por la naturaleza de las pruebas a que están sometidos.

Por otra parte los estudios de cronicidad inducidos por L-Arginina muestran que su administración continuada cursa con una atrofia pancreática similar a la que se da en humanos mostrando edema intercelular con infiltración de leucocitos, necrosis del parénquima y los exámenes histológicos revelaron una marcada deposición de tejido adiposo al final de la primera semana. En la cuarta semana, el contenido pancreático de las enzimas fue significativamente elevado.

En comparación con los modelos de etanol el curso de la enfermedad no llega a ser tan sostenido en el tiempo llegando solamente a la 6 semana.

Los modelos de pancreatitis aguda expuestos en el trabajo fueron el inducidos por L-Arginina, taurocolato sódico y cereluína.

Normalmente la enfermedad es inducida por 4 inyecciones de cereluina en ratas, a las 6 horas de la primera inyección la amilasa alcanza su máximo. Con taurocolato sódico el pico de la amilasa aparece a las 24 horas después de la infusión con taurocolato sódico. En el modelo de L-Arginina este presenta varias inconsistencias entre unos y otros siendo el que más variabilidad presenta y dando un resultado aproximado de un pico de concentración de amilasa sérica a las 12 horas. Los daños en el tejido pancreático que se observan en el modelo de cereluina son principalmente un edema e infiltración de neutrófilos, en el de L-Arginina se observa una pancreatitis aguda grave con necrosis acinar, una intensa infiltración de células inflamatorias acompañado de alta mortalidad también con taurocolato sódico se produjo una pancreatitis aguda grave con necrosis e infiltración inflamatoria. Estos tres modelos de pancreatitis aguda pueden ser implantados con éxito y aplicados para diferentes propósitos de investigación en pancreatitis aguda.

Conclusiones

- 1) Los modelos de úlcera descritos anteriormente han sido implementados con éxito siguiendo los modelos de inducción por AINEs, etanol y estrés.
- 2) Los modelos de pancreatitis inducidos por etanol/ dieta alta en grasas, L-Arginina, taurocolato sódico y cereluina han sido establecidos con éxito.
- 3) El modelo experimental de Indometacina con ácido acético en ratas produce fácilmente úlceras redondas y profundas similares a las humanas en términos de histopatología y curación.

- 4) El modelo de pancreatitis crónica inducida por etanol y dieta alta en grasas recrea las pobres elecciones dietéticas de las personas que tienen un mayor índice de padecer esta patología.
- 5) Con los modelos empleados en pancreatitis aún no se ha conseguido establecer el mecanismo exacto que origina la enfermedad, sin embargo se ha podido determinar que el aumento del estrés oxidativo es el principal desencadenante de los síntomas y las terapias enfocadas a disminuirlo dan resultados muy favorables para una enfermedad que hasta día de hoy no presenta un tratamiento específico.

Opinión personal

Los modelos de experimentación animal descritos anteriormente han sido de gran ayuda y constituyen una buena herramienta para conocer mejor la fisiopatología y la creación de nuevos tratamientos que puedan ayudar a combatir las enfermedades.

No obstante debemos caer en la cuenta de que tenemos que ser responsables de los animales que empleamos como reactivos de laboratorio y ejecutar un buen diseño de la experimentación seleccionando el animal adecuado o evitando su uso cuando el estudio no lo requiera explícitamente, justificar el número empleado de ellos y evitar cualquier sufrimiento innecesario dándoles una eutanasia que como su nombre indica sea sin dolor o estrés. Con estas pautas se pretende obtener resultados válidos, confiables, reproducibles y comparables, de esta forma siempre deberemos ser responsables desde el punto de vista ético al usar seres vivos.

Bibliografía

1. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. BIOMEDICINA, 2006, 2 (3) - 252-256
2. Crockett S, Falck-Ytter Y, Wani S, Gardner TB. Acute Pancreatitis Guideline. Gastroenterology. 2018 Mar;154(4):1102.
3. Takács T, Czakó L, Dubravcsik Z, Farkas G, Hegyi P, Hritz I, et al. [Chronic pancreatitis. Evidence based management guidelines of the Hungarian Pancreatic Study Group]. Orv Hetil. 2015 Feb 15;156(7):262-88
4. Sheth SG, Conwell DL, Whitcomb DC, Alsante M, Anderson MA, Barkin J, et al. Academic Pancreas Centers of Excellence: Guidance from a multidisciplinary chronic pancreatitis working group at PancreasFest. Pancreatology. 2017 May - Jun;17(3):419-430.
5. Mayo Clinic. Pancreatitis - Symptoms and causes. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/pancreatitis/symptoms-causes/syc-20360227>. Acceso el 15 de junio. 2018.
6. Laursen SB, Jørgensen HS, Schaffalitzky de Muckadell OB; Danish Society of Gastroenterology and Hepatology. National consensus on management of peptic ulcer bleeding in Denmark 2014. Dan Med J. 2014 Nov;61(11):B4969.
7. Madsen KR, Lorentzen K, Clausen N, Oberg E, Kirkegaard PR, Maymann-Holler N, et al. Guideline for stress ulcer prophylaxis in the intensive care unit. Dan Med J. 2014 Mar;61(3):C4811.
8. Higuera V. Peptic Ulcer: Causes, Treatment, and Prevention. Healthline. Disponible en: <https://www.healthline.com/health/peptic-ulcer#treatment>. Acceso el 10 de julio. 2018

9. Satoh K, Yoshino J, Akamatsu T, Itoh T, Kato M, Kamada T, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for peptic ulcer disease 2015. *Send to J Gastroenterol.* 2016 Mar;51(3):177-94.
10. Gisbert JP, Molina-Infante J, Amador J, Bermejo F, Bujanda L, Calvet X, et al. IV Spanish Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection treatment. *Gastroenterol Hepatol.* 2016 Dec;39(10):697-721.
11. Repiso A, Gómez R. SISTEMA BILIAR, PANCREATITIS AGUDA Y CRÓNICA. 1 ed. Madrid: Díaz De Santos; 2014
12. Amang AP, Mezui C, Siwe GT, Emakoua J, Mbah G, Nkwengoua EZ, et al. Healing and Antisecretory Effects of Aqueous Extract of *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae) on Unhealed Gastric Ulcers. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1924320.
13. Kim JH, Kwon HJ, Kim BW. Protective Effect of 4-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3-Buten-2-One from *Phellinus linteus* on Naproxen-Induced Gastric Antral Ulcers in Rats. *J Microbiol Biotechnol.* 2016 May 28;26(5):823-8.
14. Ibrahim IA, Abdulla MA, Hajrezaie M, Bader A, Shahzad N, Al-Ghamdi SS, et al. The gastroprotective effects of hydroalcoholic extract of *Monolluma quadrangula* against ethanol-induced gastric mucosal injuries in Sprague Dawley rats. *Drug Des Devel Ther.* 2015 Dec 30;10:93-105.
15. Paulrayer A, Adithan A, Lee JH, Moon KH, Kim DG, Im SY et al. *Aronia melanocarpa* (Black Chokeberry) Reduces Ethanol-Induced Gastric Damage via Regulation of HSP-70, NF- κ B, and MCP-1 Signaling. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 5;18(6).
16. Zhang W, Liu K, Li L, Li Y, Sui X, Rao Y et al. Therapeutic effect of low molecular weight chitosan containing sepia ink on ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Acta Cir Bras.* 2016 Dec;31(12):813-820.
17. Zhou ZR, Huang P, Song GH, Zhang Z, An K, Lu HW, et al. Comparative proteomic analysis of rats subjected to water immersion and restraint stress as an insight into gastric ulcers. *Mol Med Rep.* 2017 Oct;16(4):5425-5433.

18. Saxena B, Singh S. Comparison of three acute stress models for simulating the pathophysiology of stress-related mucosal disease. *Drug Discov Ther.* 2017 May 30;11(2):98-103.
19. McIlwrath SL, Westlund KN. Pharmacological attenuation of chronic alcoholic pancreatitis induced hypersensitivity in rats. *World J Gastroenterol.* 2015 Jan 21;21(3):836-53.
20. Zhang L, Kline RH 4th, McNearney TA, Johnson MP, Westlund KN. Cannabinoid receptor 2 agonist attenuates pain related behavior in rats with chronic alcohol/high fat diet induced pancreatitis. *Send to Mol Pain.* 2014 Nov 17;10:66.
21. Chen L, Ma C, Bian Y, Li J, Wang T, Su L, et al. Hydrogen Treatment Protects Mice Against Chronic Pancreatitis by Restoring Regulatory T Cells Loss. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(5):2005-2016.
22. Duan LF, Xu XF, Zhu LJ, Liu F, Zhang XQ, Wu N, et al. Dachaihu decoction ameliorates pancreatic fibrosis by inhibiting macrophage infiltration in chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2017 Oct 28;23(40):7242-7252.
23. Uçmak F, Ekin N, İbiloğlu İ, Arslan S, Kaplan İ, Şenates E. Prophylactic Administration of Silybin Ameliorates L-Arginine-Induced Acute Pancreatitis. *Med Sci Monit.* 2016 Oct 11;22:3641-3646.
24. Robles L, Vaziri ND, Li S, Takasu C, Masuda Y, Vo K, et al. Dimethyl fumarate ameliorates acute pancreatitis in rodent. *Pancreas.* 2015 Apr;44(3):441-7.
25. Arslan S, Okur MH, Zeytun H, Basuguy E, İbiloglu I, Turkoglu A, et al. A new experimental rat model of pancreatitis using Ecballium elaterium. *Int J Surg.* 2015 Nov;23(Pt A):160-4.
26. de Oliveira Andrade R, Kunitake T, Koike MK, Machado MC, Souza HP. Effects of diazoxide in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Clinics (Sao Paulo).* 2017 Feb 1;72(2):125-129.

27. Dang SC, Wang H, Zhang JX, Cui L, Jiang DL, Chen RF, et al. Are gastric mucosal macrophages responsible for gastric injury in acute pancreatitis? *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 7;21(9):2651-7.
28. Angı S, Eken H, Kilic E, Karaköse O, Balci G, Somuncu E. Effects of Montelukast in an Experimental Model of Acute Pancreatitis. *Med Sci Monit*. 2016 Aug 1;22:2714-9.
29. Wang Y, Kayoumu A, Lu G, Xu P, Qiu X, Chen L, et al. Experimental Models in Syrian Golden Hamster Replicate Human Acute Pancreatitis. *Sci Rep*. 2016 Jun 15;6:28014.